

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

GEZIELTE ATTENUIERUNG UND MARKIERUNG VON PESTIVIREN

-

CHARAKTERISIERUNG EINES VIRULENZMARKERS

&

KARTIERUNG EINES HOCHKONSERVierten EPITOPS

von Anna Katharina Tucakov geb. Seith

aus Karlsruhe

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Institut für Immunologie
des Friedrich-Loeffler Instituts
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Greifswald - Insel Riems

Mentor: Prof. Gregor Meyers

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/en: Prof.Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	10
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	12
1.	PESTIVIREN	12
1.1.	Morphologie und Genomaufbau	13
1.1.1.	Strukturprotein E ^{rns}	17
1.1.2.	Nichtstrukturprotein NS3	20
1.2.	Pathogenese.....	22
1.2.1.	Klassische Schweinepest	22
1.2.2.	Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease	25
1.3.	Zielsetzung	30
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	31
1.	MATERIAL	31
1.1.	Geräte.....	31
1.2.	Chemikalien.....	32
1.3.	Medien, Lösungen und Puffer.....	34
1.4.	Vorgefertigte Koplettsysteme.....	37
1.5.	Enzyme, Proteine und Größenmarker	38
1.6.	Synthetische Oligonukleotide	38
1.7.	Plasmide	44
1.8.	Software	51
1.9.	Verbrauchsmaterial.....	51
1.10.	Antikörper	52
1.11.	Biologisches Material	53
1.11.1.	Zellen	53
1.11.2.	Bakterienstämme	53
1.11.3.	Viren	54
1.12.	Versuchstiere	54
2.	METHODEN	54
2.1.	Methoden zur Charakterisierung von Viren	54
2.1.1.	Kultivierung von Zellen.....	54

2.1.2.	Infektion von Zellen	55
2.1.3.	Virustitration zur Bestimmung der kulturinfektiösen Dosis.....	55
2.1.4.	Konventionelle indirekte Immunfluoreszenz	56
2.1.5.	Wachstumskinetik	57
2.1.6.	RNA Extraktion.....	58
2.1.7.	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	58
2.1.8.	Analytische Agarosegelelektrophorese	59
2.1.9.	Präparative Agarosegelelektrophorese - Aufreinigung von DNA- Fragmenten	60
2.1.10.	DNA-Sequenzierung	60
2.2.	Tierexperimentelle Methoden	62
2.2.1.	Infektion	62
2.2.2.	Rücktitration der in den Studien verwendeten Viren	62
2.2.3.	Bestimmung der klinischen Punktzahl.....	62
2.2.4.	Körpertemperatur	63
2.2.5.	Blutentnahme.....	64
2.2.6.	Schlachtung	64
2.3.	Methoden zur Analyse der Proben aus Tierexperimenten	65
2.3.1.	Bestimmung der Leukozytenzahl	65
2.3.2.	Gewinnung von Leukozytenpräparationen	65
2.3.3.	Virusnachweis durch Anzucht in Zellkultur	65
2.3.4.	Virusnachweis durch real-time RT-PCR	66
2.3.5.	Serumneutralisationstest - Nachweis neutralisierender Antikörper	68
2.3.6.	ELISA	70
2.4.	Molekularbiologische Methoden	70
2.4.1.	Nukleinsäure basierte Methoden.....	70
2.4.1.1.	PCR	70
2.4.1.1.1.	Standard PCR.....	70
2.4.1.1.2.	Fusions-PCR.....	71
2.4.1.1.3.	Quik Change-PCR.....	72
2.4.1.2.	Restriktionsenzymspaltung.....	73
2.4.1.3.	Dephosphorylierung der DNA.....	74
2.4.1.4.	Auffüllen von 3'-Überhängen oder Entfernen von 5'-Überhängen zu glatten Enden restriktionsenzymgespaltener DNA.....	74
2.4.1.5.	Ligation der DNA	75
2.4.1.6.	In vitro Transkription	75

2.4.1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion	76
2.4.1.8. Elektroporation	76
2.4.2. Mikrobiologische Methoden	77
2.4.2.1. Herstellung von Agarplatten.....	77
2.4.2.2. Herstellung kompetenter Zellen.....	77
2.4.2.3. Hitzeschocktransformation	78
2.4.2.4. DNA-Präparation.....	78
2.4.2.4.1. DNA-Minipräparationen	78
2.4.2.4.2. DNA-Midipräparationen	79
2.4.3. Proteinanalytische Methoden.....	79
2.4.3.1. Transiente Proteinexpression mittels Vacciniavirus MVA T7	79
2.4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz Zeiss Axiovert Apotome	80
2.4.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	81
2.4.3.4. Transfer der Proteine auf Membran (Western Blot).....	82
2.4.3.5. Immundetektion der Proteine.....	82
2.4.3.6. Nachweis eines Proteins mit mehreren Antikörpern auf derselben Membran	83
IV. ERGEBNISSE	84
1. BEDEUTUNG DER DIMERISIERUNG DES E^{RNS} PROTEINS FÜR DIE VIRULENZ VON PESTIVIREN	84
1.1. Pathogenitätsstudie I - TV #61/13	85
1.1.1. Charakterisierung der zu untersuchenden Viren	85
1.1.2. Auswahl und Bezeichnung der Tiere	86
1.1.3. Zeitplan und Probenentnahme	87
1.1.4. Infektion und Rücktitration der eingesetzten Viren.....	88
1.1.5. Klinische Punktzahl.....	89
1.1.6. Körpertemperatur	90
1.1.7. Leukozytenzahlen.....	93
1.1.8. Pathologie	94
1.1.9. Virusnachweis durch real-time RT-PCR.....	95
1.1.10. Virusanzucht in der Zellkultur aus Leukozytenpräparationen zur Überprüfung der Stabilität der Mutationen.....	97
1.1.11. Serologische Untersuchung – Serumneutralisationstest	99
1.1.12. Serologische Untersuchung – ELISA	100
1.1.13. Zusammenfassung Pathogenitätsstudie I - #61/13.....	101

1.2.	Pathogenitätsstudie II – TV #02/15	101
1.2.1.	Charakterisierung der zu untersuchenden Viren	101
1.2.2.	Auswahl und Bezeichnung der Tiere	102
1.2.3.	Zeitplan und Probenentnahme	103
1.2.4.	Infektion und Rücktitration der eingesetzten Viren	105
1.2.5.	Klinische Punktzahl	106
1.2.6.	Körpertemperatur	108
1.2.7.	Leukozytenzahlen	108
1.2.8.	Pathologie.....	111
1.2.9.	Virusnachweis durch real-time RT-PCR	111
1.2.10.	Virusanzucht aus Leukozytenpräparationen in Zellkultur zur Überprüfung der Stabilität der Mutationen.....	113
1.2.11.	Serologische Untersuchung – Serumneutralisationstest	115
1.2.12.	Serologische Untersuchung – ELISA	116
1.2.13.	Zusammenfassung Pathogenitätsstudie II – TV #02/15	117
2.	EPITOPKARTIERUNG	118
2.1.	Kartierung des Epitopes des panpesti mAk Code4.....	118
2.1.1.	Eingrenzung der Binderegion mit Hilfe von Deletionsbibliotheken	118
2.1.2.	Zwanzig Aminosäuredeletionen – Analyse interner Deletionen im verkürzten CP7 NS3	123
2.1.3.	Zwanzig Aminosäure Deletionen im Kontext des gesamten NS3.....	126
2.1.4.	Alaninscan der Deletionsregionen $\Delta 2$ - $\Delta 3$ mittels Pentamer- substitutionen.....	129
2.1.5.	Feinmapping des eingegrenzten Bereichs mittels Doppelalaninscan ...	133
2.1.6.	Etablierung des Markierungskonzeptes - Generierung einer Code4 negativen Virusmutante	137
2.1.7.	Panpesti Ansatz – Einführung der Mutationen PE ₃₇₂₋₃₇₃ AA sowie LG ₃₈₀₋ ₃₈₁ AA in die NS3 Proteine eines weiteren BVDV-1, zweier BVDV-2 sowie in ein CSFV NS3	139
2.1.8.	Pan Pesti Ansatz – Alaninpentamersubstitutionen im BVDV Typ 2 und CSFV NS3.....	145
2.1.9.	Strukturanalytische Daten basierend auf der Kristallstruktur der CSFV NS3 Helikase Domäne.....	149
V.	DISKUSSION.....	154
1.1.	Die optimale Vakzine – eine Utopie?	154

1.2.	Virulenzfaktoren – vom Wissen und Nicht-Wissen um biologische Funktionen	156
1.3.	Gezielte Attenuierung von Pestiviren – E ^{rns} dimerisierungsnegative Mutanten	158
1.4.	Pathogenitätsstudien zur Überprüfung des Rückgewinns von Virulenz durch Pseudoreversion und Reetablierung kovalenter Dimere.....	161
1.5.	Das DIVA-Prinzip –Markierungskonzepte für Impfstoffe.....	164
1.6.	Entwicklung von DIVA-Strategien für BVDV und CSFV	165
1.7.	Epitopkartierung – Fahndung nach hochkonservierten AS-Sequenzen	169
1.8.	Etablierung einer Code4 negativen Virusmutante	173
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	176
VII.	SUMMARY	178
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	180
IX.	ANHANG.....	201
1.	ABKÜRZUNGEN	201
2.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	205
3.	TABELLENVERZEICHNIS	207
X.	DANKSAGUNG	210

I. EINLEITUNG

Pestiviren gehören aus wirtschaftlicher Sicht zu den wichtigsten Pathogenen der Nutztiere. Trotz diverser Kontrollprogramme und Impfkampagnen stellen die verschiedenen Vertreter des Genus *Pestivirus* weltweit ein Problem dar. Infektionen mit dem Bovinen Viralen Diarrhoe Virus (BVDV) oder dem Border Disease Virus (BDV) sind auf den ersten Blick weniger fatal im Vergleich zu den Szenarien, die sich beispielsweise in der EU, bei einem Ausbruch der Klassischen Schweinepest, ausgelöst durch das gleichnamige Virus (Classical Swine Fever Virus, CSFV), ereignen. Der wirtschaftliche Verlust ist jedoch auch bei diesen Viren beträchtlich. Die Entwicklung von Impfstoffen, speziell zur Bekämpfung von BVDV und CSFV, wurde in den letzten Jahren erheblich vorangetrieben und es gibt diverse Impfstoffe auf dem Markt. Dennoch erfüllt keine dieser Vakzinen alle Kriterien einer „optimalen“ Vakzine (DONG & CHEN, 2007). Strategien zur Verbesserung von Impfstoffen um diesem Ziel näher zu kommen, bedürfen weiterhin der Grundlagenforschung und des Verständnisses um die Funktionsweisen essentieller Proteine. Nur durch weitergehende Kenntnis der Molekularbiologie von Pestiviren ist die Balance zwischen Sicherheit und Effizienz zu erreichen, die es modernen Impfstoffen ermöglicht, die Infektionskette entscheidend zu unterbinden. Arbeiten, die sich mit dem Strukturprotein E^{rn}s beschäftigen sind ein Beispiel solcher Anstrengungen. Neben der RNase-Funktion des Proteins, deren Ausschaltung nachweislich zu einer reproduzierbaren und stabilen Attenuierung in vivo führt, scheint auch die Homodimerisierung des Virulenzfaktors E^{rn}s daran beteiligt zu sein, den Viren einen biologischen Vorteil zu bringen (MEYERS et al., 1999; TEWS et al., 2009). Dieses Phänomen wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit näher analysiert.

Eine weitere Anforderung an eine optimale Vakzine ist die Möglichkeit der Differenzierung zwischen infizierten und vakzinierten Tieren. Eine Negativmarkierung im Sinne des DIVA-Konzeptes (**D**ifferentiating **I**nfected from **V**Accinated individuals, später **D**ifferentiating **I**nfected from **V**accinated **A**nimals) kann auf dem Wissen um die Lokalisation hochkonservierter Epitope

aufgebaut werden (VAN OIRSCHOT, 1999; VAN OIRSCHOT, 2001). Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Ansätze für ein solches Markierungskonzept etabliert. Es wurde ein hochkonserviertes Epitop des Nichtstrukturproteins NS3 mittels eines monoklonalen panpesti Antikörpers kartiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Virusmutante mit verändertem Epitop etabliert und das Markierungskonzept in vitro überprüft.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pestiviren

Das Genus *Pestivirus* ist zusammen mit den anderen Genera *Flavivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet. Die rein tierpathogenen Vertreter des Genus *Pestivirus* lassen sich den vier anerkannten Spezies zuordnen: Virus der Klassischen Schweinepest (CSFV), Virus der Bovinen Viralen Diarrhoe Typ 1 und 2 (BVDV-1 und BVDV-2) sowie Border Disease Virus (BDV). Zusätzlich gibt es im neuesten Report des Internationalen Komitees für Virustaxonomie vier neue vorläufige Spezies: atypische Pestiviren, Bungowannah-Virus, Giraffe-1 Pestivirus und Pronghorn Antelope Pestivirus (SIMMONDS et al., 2012). Innerhalb der Spezies können die Viren jeweils verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Diese Kategorisierung in die immer diverser werdenden Genotypen wird diskutiert, aber nur wenige wurden bisher international als Standard akzeptiert (TAUTZ et al., 2015).

Bislang galten Paarhufer als die einzige anfällige Spezies für Pestivirusinfektionen. In neueren Untersuchungen gibt es Hinweise auf neuartige Pestiviren in Ratten, Fledermäusen und Nematoden (WU et al., 2012; BEKAL et al., 2014; FIRTH et al., 2014). Die bisher bekannten Pestiviren lassen sich in zwei Hauptgruppen aufteilen: Pestiviren, die Schweine infizieren und Pestiviren der Wiederkäuer. Zu erwähnen ist hierbei, dass in Schweinen häufig Antikörper gegen ruminante Pestiviren zu detektieren sind. Folglich ist diese Spezies empfänglich für ruminante Pestiviren, wohingegen es keine Hinweise auf CSFV Infektionen in Wiederkäuern gibt (TAUTZ et al., 2015).

Eine oronasale Infektion mit den über alle Körperflüssigkeiten ausgeschiedenen Viren kann durch direkten Kontakt von Tier zu Tier aber auch über unbelebte Vektoren stattfinden. Neben der horizontalen Übertragung spielt die vertikale Transmission auf Föten eine große Rolle in der Verbreitung dieser Viren. Diese kann zur Entstehung persistent infizierter Tiere (PI-Tiere) führen, die Zeit ihres Lebens große Mengen an Virus ausscheiden (TAUTZ et al., 2015).

In Zellkultur kann man das Auftreten zweier Biotypen von Pestiviren beobachten, den zytopathogenen (cp) und nicht zytopathogenen (ncp) Typ. Ncp-Viren replizieren in Zellkultur ohne merkliche Veränderungen der infizierten Zellen, während Infektionen mit cp-Viren zum Absterben der Zielzellen führen. Interessanterweise finden sich im Feld vor allem ncp-Viren, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sich nur aus Infektion mit diesem Typ PI-Tiere entwickeln können, die ein entscheidendes Reservoir der Pestiviren darstellen und die Weiterverbreitung der Viren sichern (TAUTZ et al., 2015).

1.1. Morphologie und Genomaufbau

Pestiviren sind 40-60nm kleine, behüllte RNA Viren. Eingelagert in der aus intrazellulären Membranen stammenden Lipidhülle (LINDENBACH et al., 2013) befinden sich drei Strukturproteine E^{rn}s (ribonuclease secreted), E1 und E2. Das Nukleokapsid im Inneren der Partikel setzt sich aus dem RNA affinen Kapsidprotein C und dem Virusgenom, das aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität besteht, zusammen. Diese ca. 12,3kB lange RNA kodiert für die viralen Proteine in einem einzigen offenen Leserahmen (ORF), der von den nicht translatierten Regionen (NTR) am 5' sowie 3' Ende flankiert wird. Diese NTRs enthalten cis-aktive Elemente, welche essentiell für die virale Translation und Replikation sind. Durch virale und wirtseigene Proteasen wird das ca. 3900 Aminosäuren (AS) lange Vorläuferpolyprotein in die vier bereits erwähnten Strukturproteine (SP) sowie die Nichtstrukturproteine (NSP) N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B co- und posttranslational prozessiert (Abbildung 1; TAUTZ et al., 2015).

N^{pro} ist das erste Protein und spaltet sich autoproteolytisch vom Polyprotein ab. N^{pro} ist nicht nur eine Besonderheit der Pestiviren, sondern wurde 2012 auch einer eigenen Protease Familie C53 zugeordnet (RAWLINGS et al., 2012; TAUTZ et al., 2015). Dieses Protein ist außerdem in der Lage mit dem angeborenen Immunsystem zu interferieren. Die Detektion einer Virusinfektion durch das angeborene Immunsystem basiert auf der Erkennung von Pathogen assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), beispielsweise doppelsträngiger RNA im Cytosol der Zelle durch sogenannte Muster erkennende Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR).

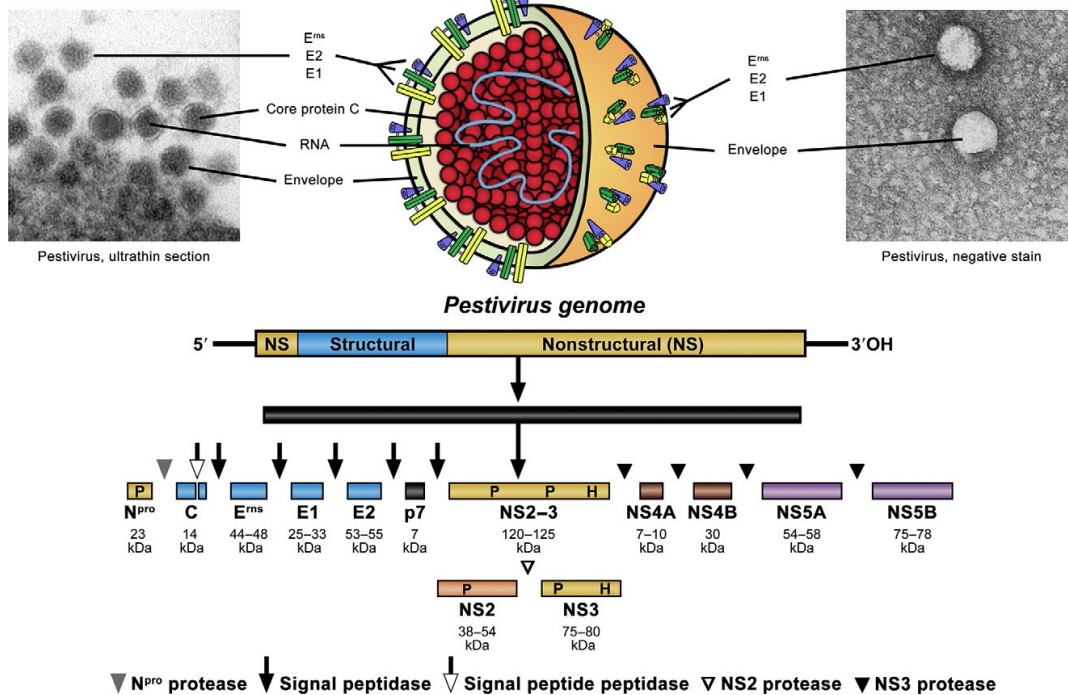


Abbildung 1: Grundlegende Eigenschaften der Pestiviren aus TAUTZ et al. (2015).

Die beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen (links BVDV im Ultradünnschnitt, rechts CSFV in der Negativkontrastierung. H. Granzow und F. Weiland, Friedrich-Loeffler-Institut) flankieren die grafische Darstellung (Design: M. Jörn, Friedrich-Loeffler-Institut) eines pestiviralen Partikels. Darunter ist das Genom der Pestiviren schematisch dargestellt. Die Translation des im Genom vorhandenen langen offenen Leserahmens führt zum dargestellten Polyprotein. Die verschiedenen Proteasen, die zur Prozessierung der einzelnen abgebildeten Proteine führen, sind unter der Grafik angegeben.

Eine zentrale Rolle in der durch PRRs angestoßenen Signalkaskade spielen die Interferon regulatorischen Faktoren 3 und 7 (IRF-3/IRF-7), welche die Produktion von Interferon α/β induzieren (KAWAI & AKIRA, 2006). IFN α/β ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort, beispielsweise für die Induktion des antiviralen Status einer Zelle, beeinflusst aber auch die Anregung der adaptiven Immunreaktion (BRUBAKER et al., 2015).

Die Induktion der Interferonantwort in der pestivirusinfizierten Zelle wird durch die N^{pro} vermittelte proteasomale Degradation von IRF-3 inhibiert (BAUHOFER et al., 2007). Eine weitere Blockade der IFN-Kaskade ergänzt die Strategie des Virus, die angeborene Immunantwort zu umgehen. Diese besteht in der Interaktion von

N^{pro} mit IRF-7, die vor kurzem in plasmazytoiden dendritischen Zellen gezeigt werden konnte (FIEBACH et al., 2011). Die Deletion der N^{pro}-Sequenz kann in CSFV-Isolaten zur Attenuierung im spezifischen Wirt führen (MAYER et al., 2004). Das Strukturprotein C folgt der Autoprotease im Polyprotein. Dem C-Protein, welches mit geringer Affinität unspezifisch RNA bindet, wird eine RNA-Chaperone-Funktion nachgesagt (IVANYI-NAGY et al., 2008; MURRAY et al., 2008). Zusätzlich wurde das CSFV C als Transkriptionsfaktor für HSP70 und des SV40 „early promoters“ vorgeschlagen (LIU et al., 1998). Das Protein ist interessanterweise kein essentielles Strukturprotein. Experimentelle Deletion des C-Proteins im CSFV kann über eine auftretende Mutation im NS3 kompensiert werden und führt zur Bildung von vitalen, morphologisch nicht vom Wildtypvirus zu unterscheidenden Viren (RIEDEL et al., 2012). Im Genus *Pegivirus*, einem weiteren Genus der Familie der *Flaviviridae*, gibt es natürlich vorkommende Stämme, die kein C-Protein codieren.

Die Prozessierung des Carboxyterminus des C-Proteins erfolgt in zwei Spaltprozessen durch Wirtszellproteasen. Im ersten Schritt wird das dem C-Protein folgende Strukturprotein E^{ns} am Ende der Signalsequenz, die zwischen C und E^{ns} liegt, durch die Signal Peptidase (SPase) abgespalten (RÜMENAPF et al., 1993). Das endgültige carboxyterminale Ende des C-Proteins wird von der Signal Peptid Peptidase (SPPase) generiert (HEIMANN et al., 2006).

Das Strukturprotein E^{ns} ist Teil der vorliegenden Arbeit und wird unter 1.1.1 ausführlicher beschrieben.

Das stromab von E^{ns} gelegene Strukturprotein E1 wird ebenfalls mittels der SPase amino- und carboxyterminal abgespalten. Weder Struktur noch Funktion dieses Proteins sind bekannt. Das integrale Membranprotein, gegen das im Tier keine nachweisbare Immunreaktion ausgelöst wird, liegt in der Membran als sich langsam formierendes Heterodimer mit dem Strukturprotein E2 vor (RÜMENAPF et al., 1993). Über das letztgenannte Strukturprotein ist deutlich mehr bekannt. Neben seiner Funktion als Rezeptorbindendes Protein ist E2 das Hauptimmunogen der Pestiviren. Vakzinierung mit E2 führt zu einer belastbaren Immunantwort im Tier (HULST et al., 1993; BRUSCHKE et al., 1997; UTTENTHAL et al., 2001). Auf diesem Prinzip beruht ein im Handel erhältlicher

Komponentenimpfstoff (Subunit-Impfstoffe; Porcilis Pesti, Intervet International BV) gegen CSFV, der nur E2 als immunogene Komponente enthält.

Den Strukturproteinen folgt im Polyprotein das Nichtstrukturprotein p7. Dieses wird ebenfalls durch die SPase vom Vorläuferprotein E2-p7 abgespalten, jedoch geschieht diese Prozessierung ineffizient (ELBERS et al., 1996). Das kleine 7kD-Protein ist an der Bildung infektiöser Partikel beteiligt (BEHRENS et al., 1998; HARADA et al., 2000). Ähnlich dem HCV p7 kann das Pestivirus p7 über seine zentrale geladene Region Ionenkanäle bilden (GONZALEZ & CARRASCO, 2003; GRIFFIN et al., 2004). Als mögliche Funktion von p7 wird eine Rolle bei der Virion-Morphogenese über Protein-Protein-Interaktionen diskutiert (WOZNIAK et al., 2010).

NS2, das folgende NSP, ist eine Cystein-Autoprotease, die unter Kontrolle eines Cofaktors, des zellulären Chaperons Jiv (J-domain protein interacting with viral protein), für die Prozessierung des NS2-3 Proteins verantwortlich ist (LACKNER et al., 2004; LACKNER et al., 2005). Kurz nach der Infektion wird NS2-3 vollständig autoproteolytisch gespalten. Im Verlauf der Infektion wird diese Spaltung jedoch sehr ineffizient aufgrund der abnehmenden Menge des zellulären Cofaktors (LACKNER et al., 2005). Über erworbene Mutationen, beispielsweise durch Insertion bestimmter zellulärer Sequenzen ins virale Genom, kommt es zu gesteigerter Expression des für die Replikation essentiellen NS3. Dies führt zur Ausprägung des zytopathogenen Effektes in Zellkultur. Verantwortlich für diesen Effekt ist vermutlich die RNA-Replikation, deren strikte Kontrolle in Folge der fortwährenden Bereitstellung von NS3 aufgehoben ist. Im ncp-Biotyp führt der Verbrauch des zellulären Cofaktors im Verlauf der Infektion zum Erliegen der NS2-NS3-Spaltung und somit zu einer Selbstregulation der pestiviralen Replikation in der Zelle (LACKNER et al., 2005). Ungespaltenes NS2-3 ist ein wichtiger Faktor für die Morphogenese infektiöser Partikel an der ER-Membran, kann aber NS3 bei der RNA-Replikation nicht ersetzen (AGAPOV et al., 1998; MOULIN et al., 2007).

Den minimalen RNA-Replikationskomplex bilden die NSPs NS3-NS5B (BEHRENS et al., 1998). Das erste Protein dieses Komplexes, der für die weitere Prozessierung der darauffolgenden Proteine verantwortlich ist, ist NS3. Dieses Protein wird unter 1.1.2 ausführlicher beschrieben. NS4A, ein ca. 10kD großes Protein, agiert

als Cofaktor der NS3 Protease (XU et al., 1997). In einer zweiten Funktion ist das Protein an der Morphogenese neuer Viren beteiligt (AGAPOV et al., 1998; MOULIN et al., 2007; LIANG et al., 2009). Der NS4A-B-Vorläufer kann in infizierten Zellen detektiert werden, aber seine Funktion und Relevanz für das Virus ist bisher noch nicht geklärt (COLLETT et al., 1991; MEYERS et al., 1992; LAMP et al., 2011; TAUTZ et al., 2015). Gespaltenes NS4B ist ein membranassoziertes Protein mit NTPase-Funktion. Dieses Protein, dessen genaue Funktion noch der Aufklärung bedarf, ist essentiell für die Virusreplikation (TAUTZ et al., 2015). Die verbleibenden zwei pestiviralen Proteine des Polyproteins sind NS5A und NS5B. Diese sind sowohl als prozessierte Einzelproteine als auch als Vorläuferprotein in der infizierten Zelle vorhanden (RÜMENAPF & THIEL, 2014). Über NS5A ist nicht viel bekannt. Es wird von zellulären Kinasen ähnlich dem NS5A von HCV phosphoryliert (REED et al., 1998). Das an intrazelluläre Membranen gebundene Protein scheint einen Einfluss auf die Regulation der RNA-Replikation zu haben (TAUTZ et al., 2015). Vorkurzem durchgeführte Mutagenesestudien konnten zum einen zeigen, dass Deletionen in bestimmten Regionen des NS5A toleriert werden können ohne Effekte auf die Replikation nach sich zu ziehen. Durch Einfügen eines Fluoreszenz-Gens (m-cherry) in NS5A konnte mit der „live cell imaging“ Technik die Lokalisation des Proteins auf der Oberfläche von „lipid droplets“ sowie im Zytoplasma assoziiert mit NS3 nachgewiesen werden (ISKEN et al., 2014). Im Vergleich zu den anderen NSPs können Defekte im NS5A in trans komplementiert werden (GRASSMANN et al., 2001). NS5B enthält die RNA abhängige RNA-Polymerase, die in vitro die de-novo-Synthese von RNA katalysiert. In vivo ist für die virale RNA Synthese das Gesamtpaket der NSPs von NS3 bis NS5B nötig (TAUTZ et al., 2015). Der C-Terminus des NS5B ist in die Bildung infektiöser Viruspartikel involviert (ANSARI et al., 2004).

1.1.1. Strukturprotein E^{ns}

E^{ns} ist eine Besonderheit der Pestiviren und besitzt eine Vielzahl von außergewöhnlichen Eigenschaften (TAUTZ et al., 2015). Es ist über einen ungewöhnlichen Membrananker in die Lipidschicht des Virions integriert, wird aber auch von infizierten Zellen sezerniert. So kann es in freier Form im zellfreien

Milieu beispielsweise im Blut infizierter Tiere nachgewiesen werden. Die im Protein enthaltene RNase-Funktion ist eine weitere Besonderheit, die so in anderen RNA-Viren nicht vorkommt.

Im Wirt werden gegen E^{rns} schwach neutralisierende Antikörper gebildet (WEILAND et al., 1992). Wird das Protein zur Zellkultur zugegeben, ist es in der Lage eine Infektion mit Pestiviren zu verhindern (HULST & MOORMANN, 1997, 2001).

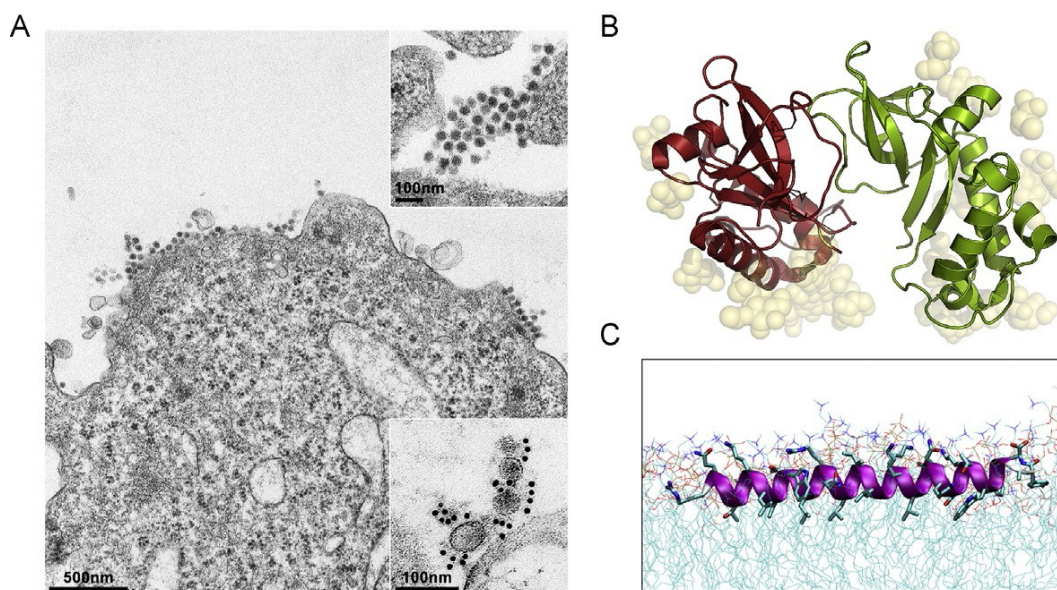


Abbildung 2: Lokalisation des E^{rns} im Viruspartikel sowie seine Struktur (Abbildung aus TAUTZ et al. (2015))

(A) Aufnahme einer BVDV-infizierten Zelle im Elektronenmikroskop. Virale Partikel sind deutlich an der Zelloberfläche zu erkennen. Der Ausschnitt in der rechten, oberen Ecke zeigt die Partikel in höherer Vergrößerung. Im Ausschnitt in der rechten, unteren Ecke wurden CSFV-Partikel mittels Gold markiertem anti E^{rns} -Antikörpern sichtbar gemacht. (H.Granzow, Friedrich-Loeffler-Institut). (B) Strukturdarstellung der E^{rns} -Ektodomäne als Dimer. Die Basis der Abbildung bilden die Strukturinformationen des E^{rns} aus KREY et al. (2012). Die einzelnen E^{rns} -Monomere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die weißen Kugeln verdeutlichen die Glykolysierung des Proteins. (C) Molekulardynamik-Simulation der Struktur des E^{rns} -Membranankers aus ABERLE et al. (2014).

Das für die Bildung infektiöser Viruspartikel essentielle, hoch glykosylierte Protein besteht aus 227 Aminosäuren, hat nach Elektrophoresedaten eine molekulare Größe von 42-48kD und liegt in der Regel als Homodimer vor. E^{rns} enthält 8-9 konservierte Cysteine, welche für die Ausbildung von vier intra- und einer intermolekularen Disulfidbrücke verantwortlich sind. Diese intermolekulare Disulfidbrücke verbindet zwei E^{rns}-Monomere und wird über das Cystein 171 vermittelt. Dieses am weitesten c-terminal gelegene Cystein ist das einzige nicht vollständig konservierte Cystein im E^{rns} der Pestiviren (HULST et al., 2001; TEWS et al., 2009). Wird die Ausbildung von E^{rns}-Homodimeren durch Mutation oder Deletion des Cysteins 171 verhindert, führt dies zu Viren mit geringfügigem Wachstumsnachteil in vitro im Vergleich zu dimerisierungskompetenten Viren. In vivo haben die Veränderungen einen signifikanten Einfluss auf die Virulenz der Erreger: Sie führen zur Attenuierung des Virus in seinem natürlichen Wirt (TEWS et al., 2009). In Tierversuchen, die die Auswirkung der C₁₇₁-Veränderungen im natürlichen Wirt untersuchten, konnte eine Pseudoreversion isoliert werden. Die fragliche Genommutation führt zur Veränderung des Serins an Position 209 zu Cystein (S₂₀₉C). In-vitro-Untersuchungen des entstandenen Proteins ergaben, dass bei der Pseudorevertante die Dimerisierungsfähigkeit wieder hergestellt wurde und es zur Ausbildung von E^{rns}-Homodimeren kommt (G.Meyers, nicht veröffentlichte Daten). Eine In-vivo-Studie, die den Einfluss der Pseudoreversion an Position 209 in Kombination mit den attenuierenden Veränderungen des Cysteins 171 untersuchte, ergab Hinweise auf partiell wiedergewonnene Virulenz dieser Viren (WIRTZ, 2013).

Die oben beschriebene Pseudoreversion S₂₀₉C befindet sich im Membrananker des E^{rns}. Dieser ist eine weitere Besonderheit des Strukturproteins, weil dieser nicht membranproteintypisch die Lipidschicht durchspannt, sondern unter Ausbildung einer amphipathischen Helix planar in die Membran integriert ist (ABERLE et al., 2014). Diese amphipathische Helix enthält das Retentionssignal, das für die intrazelluläre ER-Lokalisation des Proteins verantwortlich ist (BURRACK et al., 2012). Der spezielle Membrananker scheint eine essentielle Rolle für die Balance zwischen Retention und Sekretion des Proteins zu spielen (TAUTZ et al., 2015).

Eine weitere Besonderheit dieses Proteins ist seine intrinsische RNase-Funktion. Die enzymatische Funktion der zur Familie der T2-RNasen gehörigen RNase ist nicht essentiell für das Virus. Ausschaltung des aktiven Zentrums des Enzyms führt zu lebensfähigen Viren mit attenuiertem Phänotyp im natürlichen Wirt (MEYERS et al., 1999; MEYER et al., 2002). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass E^{ns} in der Lage ist, die Interferon-Antwort in dsRNA und ssRNA stimulierten Zellen zu unterbinden (IQBAL et al., 2004; MAGKOURAS et al., 2008; MÄTZENER et al., 2009). Die im Blut von PI-Tieren gefundenen Konzentrationen an E^{ns} sind ausreichend um diese Funktion auch in vivo zu erfüllen (MAGKOURAS et al., 2008). Für die RNase-Funktion selbst spielt es keine Rolle, ob E^{ns} also Monomer oder Dimer vorliegt, beide Formen enthalten eine aktive RNase. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich Monomer und Dimer etwas in den Werten für Substrataffinität und –spaltung unterscheiden (KREY et al., 2012). Hinsichtlich der biologischen Funktion gibt es aber dennoch Hinweise auf fundamentale Unterschiede zwischen monomeren und dimeren RNasen. Anhand einer weiteren als Dimer vorkommenden RNase, der „Bovinen Seminalen“-Ribonuklease (BS-RNase), konnte gezeigt werden, dass die biologische Funktion nur vom Dimer erfüllt wird, obwohl enzymatische Aktivitäten in beiden Formen nachzuweisen sind (KIM et al., 1995b).

Die verschiedenen Funktionen des E^{ns} als Strukturprotein und Virulenzfaktor, sowie der Einfluss, den verschiedene Veränderungen an diesem Protein für die klinische Ausprägung der Virusinfektion haben, machen E^{ns} für weitere Untersuchungen besonders interessant.

1.1.2. Nichtstrukturprotein NS3

Das Nichtstrukturprotein NS3 ist ein ca. 80kD großes, multifunktionelles Protein, dessen enzymatische Aktivitäten es zu einem essentiellen Virusprotein machen (GU et al., 2000). NS3 ist Teil des RNA-Replikationskomplexes. Im aminoterminalen Drittel des Proteins ist eine Protease-Funktion lokalisiert, die restlichen zwei Drittel beinhalten NTPase Aktivität sowie die Helikasedomäne (GORBALENYA et al., 1989; WARRENER & COLLETT, 1995). Das Protein ist innerhalb des Genus *Pestivirus* hochkonserviert, was sich auf seine essentiellen

Funktionen für die Virusreplikation zurückführen lässt (HERTIG et al., 1995; XU et al., 1997; BROWN et al., 2002).

Die chymotrypsin-ähnliche Serinprotease des NS3 benötigt NS4A als Cofaktor zur Prozessierung des Vorläuferpolyproteins an den Spaltstellen NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/NS5B (XU et al., 1997; TAUTZ et al., 2000). Die Protease-Funktion des Proteins steht im Verdacht, an der Induktion/Regulation des zytopathogenen Effektes von cp-Pestiviren beteiligt zu sein. Untersuchungen in Zellkultur ergaben, dass exprimiertes NS3-4A in MDBK-Zellen zu Aktivierung der Caspasekaskade und Apoptose führt. Exprimiertes NS2-3-4A sowie Protease inaktiviertes NS3-4A bewirkten hingegen keine Apoptose (GAMLEN et al., 2010).

Im carboxyterminalen Bereich des Proteins sind die NTPase- sowie die Helikase-Funktion lokalisiert. Die NS3-Helikase ist Mitglied der Superfamilie 2 DexH/D-Box-Helikasen und entwindet im Replikationsprozess auftretende doppelsträngige RNA-Intermediate (SINGLETON et al., 2007; MODROW et al., 2010; TAUTZ et al., 2015). Dabei ist die RNA-Bindungsaffinität aber nicht auf virale RNA beschränkt (GRASSMANN et al., 1999).

Eine weitere Funktion des Proteins hat sich im CSFV Kontext eröffnet. Nach Deletion des C-Proteins und einer einzigen kompensierenden Mutation im Bereich der Helikase konnte das NS3-Protein das fehlende C-Protein bei der Virionmorphogenese funktionell ersetzen (RIEDEL et al., 2012).

Neben den Strukturproteinen E2 und E^{ns} ist NS3 eines der immundominanten Antigene der Pestiviren. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Antigenen ist NS3 aber wie zu erwarten nicht in der Lage, die Bildung neutralisierender Antikörper zu induzieren (TAUTZ et al., 2015). NS3 scheint neben der humoralen auch die zellvermittelte Immunantwort zu stimulieren. Es konnte als potentes T-Zell-Antigen identifiziert werden, das in vitro in der Lage ist, IFN- γ Produktion und Freisetzung, Lymphoproliferation sowie die cytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren und CD4⁺ T-Helferzellen zu aktivieren (RAU et al., 2006). Im Protein konnten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zell-Epitope identifiziert werden (ARMENGOL et al., 2002). Studien in Kälber ergaben, dass nach DNA-Vakzinierung mit NS3 und BVDV-Challenge trotz der fehlenden neutralisierenden Antikörper eine ähnliche Protektion erzielt werden konnte wie nach Immunisierung mit E2 (YOUNG et al., 2005).

Die Immundominanz sowie die hohe Konservierung des Proteins macht NS3 zum idealen Antigen für den Nachweis von Pestiviren. Diverse ELISA-Testsysteme für BVDV basieren auf diesem Prinzip und können NS3 Antikörper in Serum, Plasma oder in Milch nachweisen (PATON et al., 1990; KRAMPS et al., 1999; BHATIA et al., 2007).

Monoklonale Antikörper gegen NS3, die für den Virusnachweis genutzt werden, sind zum Teil panpesti spezifisch. Eine Speziesdiskriminierung ist mit ihnen nicht möglich. Nur wenig ist über diese hochkonservierten Panpesti-Epitope bekannt. Zwei immundominate Regionen im Bereich der Helikase sowie ein BVDV-1 spezifisches Epitop des Proteins konnten mittels einer Auswahl an mAbs und bovinem Serum identifiziert werden (BROWN et al., 2002; DEREGT et al., 2005). Eine weitere Studie, die die Antigen-Antikörper Interaktion untersuchte, bestätigte diese Ergebnisse und identifizierte drei weitere Peptidfragmente im Bereich der Protease, die von BVDV positiven Seren erkannt wurden (LI et al., 2013). Ob Veränderungen an diesen Erkennungssequenzen vom Virus toleriert werden und diese somit als potentielle Markerregionen für Impfstoffkonzepte in Frage kommen ist nicht bekannt.

1.2. Pathogenese

Infektionen mit Pestiviren in empfänglichen Tieren können klinisch inapparent verlaufen, aber auch zu schweren, tödlichen Verlaufsformen führen. Hierbei ist die Virulenz der einzelnen Stämme genotypunabhängig, auch wenn dies auf den ersten Blick indiziert werden könnte (BEER et al., 2015; TAUTZ et al., 2015). Von allgemeiner Relevanz für die klinischen Ausprägungen sind der Immunstatus sowie das Alter des infizierten Tieres. Die klinischen Bilder und wichtigsten Fakten der Infektion mit CSFV und BVDV werden in den nächsten Abschnitten genauer beschrieben.

1.2.1. Klassische Schweinepest

In ersten Beschreibungen wird die Klassische Schweinepest als eine schwere perakute bis akute hämmorrhagische Erkrankung mit kurzer Inkubationszeit und hoher Mortalitätsrate definiert (DUNNE, 1973). Das beschriebene Krankheitsbild hat sich über die Jahre verändert: Der perakute Krankheitsverlauf ist weitgehend

verschwunden und die extrem hohen Mortalitätsraten werden bei akuten Verlaufsformen nicht mehr erreicht. Dafür haben sich über die Jahre chronische Formen der klassischen Schweinepest durch graduelle Attenuierung des Virus entwickelt (WENSVOORT & TERPSTRA, 1985). Die Viren der klassischen Schweinepest können in ihrer Virulenz als niedrig, moderat bis hin zu hochvirulent eingestuft werden (MITTELHOLZER et al., 2000).

Hochvirulente Virusstämme lösen das klassische Krankheitsbild aus, das durch hohes Fieber und starke Leukopenie gekennzeichnet ist. ZNS-Symptomatiken, wie Ataxien und Paresen der Hinterhand können beobachtet werden. Gastrointestinale Störungen, die bis zu blutiger Diarrhoe reichen können, führen zum Kümern der Tiere. Pathognomisch ist das Auftreten eines hämorrhagischen Syndroms mit Petechien und Ekchymosen auf Haut und Schleimhaut sowie zyanotisch verfärbten Ohren und distalen Gliedmaßen (TAUTZ et al., 2015).

Chronische Verlaufsformen werden durch weniger virulente Stämme ausgelöst. Es ist anzumerken, dass der Verlauf der Infektion und die damit zu beobachtende Klinik neben der Virulenz des Stammes von Alter und Immunstatus des Tieres abhängig sind. Symptomatisch beinhaltet die chronische Form eine milde Ausprägung der schweinepesttypischen Symptome, verringerte Virämie sowie eine gestörte Immunantwort des Wirts. Der letale Krankheitsverlauf kann sich bis zu drei Monaten hinziehen (RÜMENAPF & THIEL, 2014).

Infektionen mit niedrig virulenten Stämmen können klinisch inapparent verlaufen. Beide Verlaufsformen, chronisch sowie klinisch inapparent, tragen durch konstante, lange Zeit unentdeckte Virusausscheidung zur Verbreitung des Virus bei.

Ein weiterer wichtiger Faktor der Infektion mit CSFV ist die diaplazentare Übertragung des Virus auf die Föten. Im Falle einer Infektion des Muttertieres kann das Virus die Plazenta (Placenta epitheliochorialis) passieren. Die neutralisierenden Antikörper des serokonvertierten Muttertieres können diese Barriere jedoch nicht überwinden. Die Folgen der Infektion sind vom Alter der Sauen, der Pathogenität des infizierenden Stamms sowie vom Gestationsstadium abhängig. Kommt es zur Infektion im frühen Trächtigkeitsstadium, können Aborte und Totgeburten aber auch Mumifikation und Missbildungen beobachtet

werden (MOENNIG & GREISER-WILKE, 2008). Infektionen etwa im zweiten Drittel der Trächtigkeit können zur Entstehung von persistent infizierten Ferkeln führen (LIESS et al., 1984). PI-Tiere sind nach der Geburt von gesunden Ferkeln nicht zu unterscheiden, bleiben aber im Laufe ihres kurzen Lebens in ihrer Entwicklung zurück und erliegen der Krankheit. Die bis zu elf Monate andauernde Erkrankung wird auch als Spätform der klassischen Schweinepest angesehen (VAN OIRSCHOT, 1992). Findet die Infektion der trächtigen Sau im letzten Gestationsdrittel statt, so können nicht virämische, gesunde Ferkel geboren werden. In dieser Phase kann das sich entwickelnde Immunsystem des Fötus das Virus eliminieren (MEYER et al., 1981; RÜMENAPF & THIEL, 2014). Ein interessanter Fakt ist, dass in einem Wurf infizierte und/oder mumifizierte Föten aber auch nicht infizierte, gesunde Ferkel geboren werden können, was an der Besonderheit der Placenta von Schweinen liegt (VAN OIRSCHOT, 1979; MEYER et al., 1981; RÜMENAPF & THIEL, 2014).

Die klassische Schweinepest ist eine von der Weltorganisation für Tiergesundheit gelistete Krankheit, die vor allem in Asien, Zentral- und Südamerika, Afrika und Teilen von Europa endemisch ist. Ausbrüche führen zu enormen wirtschaftlichen Verlusten. Neben der Keulung von Tieren aus Schweinebetrieben ganzer Landstriche führen Einschränkungen des Handels mit Schweinen und Schweineprodukten zu diesen nicht unerheblichen Verlusten (DONG & CHEN, 2007). In Deutschland ist die Bekämpfung der anzeigepflichtigen Krankheit in der Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die afrikanische Schweinepest geregelt, die die Richtlinien der EU (2001/89/EG) umsetzt. Neben dem Verbot des Verfütterns von Küchen- und Speiseabfällen ist das Heil- und Impfverbot Teil der allgemeinen Schutzmaßnahmen. Die Richtlinie sieht es jedoch vor, dass im Falle eines Seuchenausbruchs das Impfverbot nach Erstellung und Prüfung des Notimpfplans durch die EU gelockert werden kann. Impfstoffe zur Anwendung in einem Notimpfplan sollten eine möglichst schnelle Induktion einer belastbaren Immunität sowie ein Markerkonzept aufweisen. Bis vor kurzem erfüllten zugelassene Schweinepestvakzine immer nur eines dieser Kriterien. Der weltweit am häufigsten eingesetzte, durch zahlreiche Passagen im Kaninchen attenuierte Lebendimpfstoff „C-Stamm“ führt zur schnellen Induktion einer belastbaren Immunität. Tiere, die mit dem C-Stamm immunisiert wurden, lassen

sich jedoch nicht von Feldstamm-infizierten Tieren unterscheiden. Welche Veränderungen im C-Stamm durch welche Mechanismen zur Attenuierung des Virus führen, ist bis heute noch nicht aufgeklärt (TAUTZ et al., 2015). E2-Subunit Impfstoffe, die auf Expression des hochimmunogenen Strukturproteins E2 basieren, erfüllen das Markerprinzip (HULST et al., 1993; UTTENTHAL et al., 2001). Mittels eines E^{rns}-ELISA können feldvirusinfizierte Tiere von geimpften Tieren serologisch unterschieden werden. Allerdings ist das Einsetzen einer belastbaren Immunantwort im Tier verzögert und somit sind diese Vakzinen zur Notimpfung nur bedingt geeignet. Es gibt viele weitere Ansätze zur Entwicklung von CSFV-Impfstoffkandidaten: Immunisierung mit Peptiden oder DNA-Vakzinen, Einsatz von Replikonsystemen oder pestiviralen Chimären (BEER et al., 2007; DONG & CHEN, 2007). Vor kurzem wurde der chimäre Impfstamm CP7-E2alf (Suvaxyn®CSF Marker, Zoetis) zugelassen, der die Vorteile einer Lebendvakzine mit einem DIVA-Konzept vereint. Das verwendete Impfvirus basiert auf einem BVDV, bei dem die für das Hautpimmunogen E2 codierende Region durch die des CSFV Alfort/187 ersetzt wurde (BEER et al., 2007). Dieser Impfstoff induziert schnell eine belastbare Immunität und kann mit einem E^{rns}-ELISA als differenzierenden Test kombiniert werden (KOENIG et al., 2007; LEIFER et al., 2009). Chimäre Impfstoffe sind jedoch nicht ganz unumstritten. Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung einer sicheren und effektiven CSFV-Vakzine beruht auf dem Wissen um attenuierende Mutationen. Entsprechende definierte attenuierende Mutationen könnten bei der Entwicklung von modifizierten Lebendvakzinen in Kombination mit markierenden Veränderungen, z.B. an hochkonservierten Epitopen zur Diskriminierung geimpfter Tiere, zur Anwendung kommen (TAUTZ et al., 2015).

1.2.2. Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease

Ganz im Gegensatz zu den frühen Beschreibungen der klassischen Schweinepest wird die Bovine Virusdiarrhoe in ersten Darstellungen als übertragbare Krankheit von Rindern mit einer hohen Morbidität aber niedriger Mortalität definiert (RÜMENAPF & THIEL, 2014). Ramsey und Chivers beschrieben 1953 ein zweites durch BVDV ausgelöstes Krankheitsbild mit fatalem Ausgang: die Mucosal Disease (MD). Dass diese Krankheit, gekennzeichnet durch Fieber, Anorexie,

Lethargie, Dehydrierung, mukopurulenten Nasenausfluss und profuse blutige Diarrhoe, von ein und demselben Pathogen wie die unspektakuläre BVD ausgelöst wird, wurde erst später aufgeklärt (RAMSEY & CHIVERS, 1953; RÜMENAPF & THIEL, 2014). Die an MD erkrankten Tiere verstarben innerhalb von ca. zwei Wochen und zeigten in der Pathologie starke Ulzerationen des gesamten Gastrointestinaltrakts (RÜMENAPF & THIEL, 2014).

Nach horizontaler Infektion hängt der klinische Verlauf der Infektion vom infizierenden Virusstamm ab. Die meisten akuten Infektionen verlaufen klinisch inapparent oder mit sehr milder Symptomatik. Diese Symptome können mildes Fieber, Diarrhoe, erhöhter Nasenausfluss und vorübergehende Leukopenie sein (TAUTZ et al., 2015). Die daraus resultierende Immunsuppression des erkrankten Tieres bietet eine ideale Basis für sekundäre Infektionen (BRACKENBURY et al., 2003; CHASE, 2013). Seroepidemiologische Studien ergaben Hinweise, dass die meisten Rinder im Laufe ihres Lebens eine Infektion mit BVDV durchmachen (RÜMENAPF & THIEL, 2014).

Hämorrhagisches Fieber mit ausgeprägter Thrombozytopenie und hoher Mortalität ist eine weitere klinische Ausprägung bei postnatal akut mit BVDV infizierten Tieren. Das Bild ähnelt dem der akuten Klassischen Schweinepest. Diese klinische Beobachtung im Rind wurde 1989 erstmals beschrieben (CORAPI et al., 1989; CORAPI et al., 1990a). Über Sequenzanalysen konnte aufgeklärt werden, dass diese Erkrankung durch Viren ausgelöst wurde, die einer eigenen Spezies, BVDV-2, zu zuordnen waren. Im Nachhinein ergaben Analysen, dass Viren die schon längere Zeit vor dem Auftreten des hämorrhagischen Fiebers im Umlauf waren, dieser neuen Spezies zugeordnet werden konnten. In Deutschland führte eine ungewöhnliches BVDV-2, das auf einem Equilibrium aus zwei Varianten zu bestehen scheint, zu Infektionen mit besonders fatalen Krankheitsverläufen (JENCKEL et al., 2014). Die Annahme, dass BVDV-2 im generellen die virulentere BVDV-Spezies darstellt, konnte revidiert werden, denn auch ncp-BVDV-1 Stämme sind, entgegen der ursprünglichen Meinung, in der Lage hämorrhagische Krankheitsverläufe zu induzieren (TAUTZ et al., 2015).

Aber nicht diese fatalen Krankheitsbilder sondern vorübergehende Infertilität, Resorption, Aborte, Missbildungen oder die Geburt von PI-Tieren sind für den größten Teil des wirtschaftlichen Schadens durch BVDV Infektion verantwortlich

(MOENNIG & BECHER, 2015). Die Geburt von PI-Tieren ist nur möglich, wenn es zur Infektion der Föten zwischen Tag 40-120 der Trächtigkeit mit einem ncp-BVDV kommt (TAUTZ et al., 2015). Im Unterschied zu diesen Viren sind cp-BVDV nicht in der Lage im Fötus eine persistente Infektion zu etablieren (CASARO et al., 1971; BROWNLIE et al., 1989). Im oben genannten Zeitfenster sind die Föten überlebensfähig aber nicht in der Lage, angemessen auf die Infektion zu reagieren, da die Entwicklung des adaptiven Immunsystems nicht weit genug fortgeschritten ist. Ncp-BVDV ist in der Lage im Fötus die IFN I Induktion zu behindern, so dass die Entwicklung einer persistenten Infektion ermöglicht wird, im Gegensatz zu cp-BVDV, das nach fötaler Infektion zu einer starken Anregung der IFN I Antwort führt (CHARLESTON et al., 2001). Neuere Untersuchungen ncp-BVDV infizierter Föten konnten zeigen, dass es nicht zu einer kompletten Inhibierung des angeborenen Immunsystems kommt, sondern schwache Reaktionen nachweisbar waren und es zu chronischer Hochregulierung der Interferon stimulierten Gene (ISG) im Verlauf einer fötalen Infektion kommt (SMIRNOVA et al., 2012; SMIRNOVA et al., 2014). Die effektive Inhibierung der angeborenen Immunantwort führt im ncp-BVDV infizierten Fötus zur ausbleibenden Induktion der spezifischen humoralen oder zellvermittelten Immunantwort. So werden Tiere geboren, die immuntolerant gegenüber dem Virus sind. Diese permanent und in hohem Maße Virus ausscheidenden Tiere können augenscheinlich gesund zur Welt kommen und sich auch reproduzieren (TAUTZ et al., 2015). Fatal wird es für das PI-Tier, wenn es sich zusätzlich mit einem cp-BVDV infiziert. Eine solche Superinfektion kann durch Rekombinationsereignisse ausgelöst werden, bei denen in de novo generierten Viren eine cp-Variante des persistierenden ncp-BVDV auftritt (TAUTZ et al., 2015). Dieses sporadische Ereignis führt zur MD, der die Tiere innerhalb von zwei Wochen erliegen. Die Mortalitätsrate liegt bei 100% (BAKER, 1987). Entwickelt sich in einer Herde mit mehreren PI-Tieren in einem Tier ein cp-Virus, kann es zu einer Übertragung dieses Virus auf die anderen PI-Tiere der Herde kommen (DARWEESH et al., 2015). Infiziert sich ein PI-Tier mit einem exogenen cp-Stamm, kann dies folgenlos bleiben oder es kann zur Entstehung einer eher chronischen MD führen. Die abweichende Entwicklung des Krankheitsgeschehens beruht auf den antigenetischen Unterschieden des superinfizierenden cp-Virus gegenüber

des ncp Virus, die zur Erkennung des cp-Virus durch das Immunsystem des PI-Tieres führen. Kommt es zu Rekombination des im PI-Tier vorherrschenden ncp-Virus mit dem fremden cp-Virus, kann dies zur Entwicklung der Spätform der MD führen (TAUTZ et al., 2015).

BVDV kommt nahezu weltweit vor und es wird vermutet, dass sich ca. 80% der gesamten Rinderpopulation mit BVDV infizieren werden (RIDPATH, 2010). Allein in den USA führt diese Infektion pro Jahr zu geschätzten Verlusten von 400 Million US-Dollar und zählt dort zu den kostenintensivsten Rinderkrankheiten (HANSEN et al., 2015). In Europa wurden Kontrollprogramme zur Bekämpfung des BVDV implementiert, diese sind allerdings für die einzelnen Mitgliedstaaten weder verpflichtend noch einheitlich geregelt, sondern obliegen der Entscheidung der Einzelstaaten. Seit 2004 sind PI-Tiere in Deutschland meldepflichtig und 2011 wurde ein systematisches Programm implementiert, das die Testung aller neu geborenen Kälber auf persistente Infektion sowie das Eliminieren aller PI-Tiere vorsieht. Impfungen sind in diesem Programm optional (MOENNIG & BECHER, 2015).

1961 wurde die erste BVDV-MLV basierend auf einem cp-BVDV von COGGINS et al. (1961) entwickelt. Heute sind allein in den USA über 160 verschiedene Vakzine, MLV sowie Totimpfstoffe, lizenziert (RIDPATH, 2013; MOENNIG & BECHER, 2015). Diese hohe Anzahl der entwickelten Vakzine lässt auf die Problematik der BVDV-Impfstoffe blicken. Die ersten MLVs basierten auf cp-Viren, und brachten einige Sicherheitsrisiken mit sich. Neben der Beobachtung, dass ein kleiner Prozentsatz an Tieren nach der Impfung an MD erkrankte, brachte die Immunsuppression nach Impfung sowie ncp-BVDV kontaminierte MLV-Chargen diese Vakzinen in Verruf (RIDPATH, 2013). Die Kontamination wurde durch ncp-BVDV haltiges FCS, welches zur Produktion der Vakzine benötigt wurde, eingeschleppt und führte nach Impfung zur Geburt von PI-Tieren. Um die Sicherheitsrisiken gering zu halten, wurden diese Vakzinen für die Anwendung im nicht trächtigen Tier beschränkt. Die Entwicklung von Totimpfstoffen sollte diese Problematik umgehen. Um die deutlich schlechtere Wirksamkeit der inaktivierten Impfstoffe zu steigern, wurden potente Adjuvantien eingesetzt. Dies führte jedoch wiederum zum nächsten Problem: der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). Spontane Blutungen und Zerstörung

des roten Knochenmarks prägten diese Krankheit, die bei ca. zehn Tage alten Kälbern auftrat. Das als „Blutschwitzen“ bezeichnete Krankheitsbild konnte mit der Impfung der Muttertiere mit einem inaktivierten Impfstoff in Verbindung gebracht werden, genauer gesagt auf gegen Bestandteile der Vakzine induzierte Alloantikörper (DEUTSKENS et al., 2011). Entsprechend sind Verbesserungen bei BVDV Impfstoffen weiterhin notwendig. Die Abdeckung der immunogenen Bandbreite der zahlreichen, zirkulierenden Virusstämme, Induktion einer belastbaren Immunität und Kreuzimmunität mit dem Schutz vor fötaler Infektion sind wichtige Parameter für die Entwicklung solcher neuen Vakzine. Besonders Letzteres ist im Zusammenhang mit prophylaktischer Impfung und den implementierten Eradikationsprogrammen in den Vordergrund gerückt.

Seit Anfang 2015 ist Bovela® (Boehringer Ingelheim Vetmedica) als BVDV Lebendvakzine auf dem Markt, die aus einer Kombination aus attenuiertem BVDV-1 und BVDV-2 besteht. Die Attenuierung der beiden Vakzinestämme dieses Impfstoffes basiert auf zwei gezielten, attenuierenden Veränderungen an Virulenzfaktoren des Virus. Diese Kombination macht die Vakzine auch sicher für die Anwendung bei trächtigen Tieren und schützt zudem vor fötaler Infektion (MEYERS et al., 2007).

Tiere, die mit Bovela® immunisiert wurden, sind jedoch serologisch nicht von feldvirusinfizierten Tieren zu unterscheiden. Nachweise für BVDV beruhen hauptsächlich auf serologischen Tests. Derzeit kommerziell erhältliche ELISA-Testkits ermöglichen den Nachweis von E2, E^{rns} und NS3 spezifischen Antikörpern in Serum, Plasma und Milch. In der Praxis werden häufig Herdenmilchproben getestet, um den Bestand auf BVDV-Antikörper zu testen (RÜMENAPF & THIEL, 2014).

Die Identifikation von PI-Tieren hingegen ist über serologische Tests nicht möglich. Um diese Tiere zu erkennen, werden Ohrstanzpoben, Hautbiopsien oder Leukozyten auf pestivirale RNA oder Antigene untersucht (RÜMENAPF & THIEL, 2014).

1.3. Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten wurde über Pestiviren viel geforscht, molekulare Mechanismen aufgedeckt sowie diverse Ansätze zur Impfstoffentwicklung verfolgt. Dennoch sind noch viele Fragen offen, die diese besonderen Pathogene betreffen und die „optimale“ Vakzine ist noch nicht entwickelt.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die bei Replikation und Interaktion von Pestiviren mit der Wirtszelle und dem Wirtsorganismus eine signifikante Rolle spielen, gehört zu den Zielen der Forschung. Eine interessante Frage betrifft den besonderen Effekt der Dimerisierung des Virulenzfaktors E^{ns}. Aufbauend auf vorausgegangenen Arbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit, tierexperimentelle Studien durchgeführt, die die Auswirkung der Dimerisierung über eine alternative Bindungsstelle mit der attenuierten dimerisierungsnegativen Virusmutante und dem Wildtypvirus verglichen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Ansatzpunkt zur Entwicklung der „optimalen“ Vakzine aufgegriffen, der nach einer serologisch eindeutig zu unterscheidenden Markierung von Impfviren gegenüber dem Feldvirus. Im Detail ging es um die Identifizierung hochkonservierter immundominanter Epitope. Veränderung solcher Epitope könnte die Diskriminierung geimpfter und feldvirusinfizierter Tiere ermöglichen und helfen ein DIVA-Konzept für MLVs zu etablieren, das nicht auf chimären Viren basiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein konserviertes panpesti Epitop im NS3-Protein zu kartieren, ein auf diesem Epitop basierendes Markierungskonzept zu erarbeiten und lebensfähige Virusmutanten *in vitro* zu generieren, charakterisieren und auf das Markierungskonzept zu überprüfen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte

AB Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Analysenwaage Satorius Analytic	Satorius, Göttingen
C-1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Lab., USA
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, USA
Eismaschine Manitowoc Ice	Manitowoc Ice, USA
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Lab., USA
Elektroporator PG200 Progenetor II	Hoefer, USA
ELISA-Reader Sunrise	Tecan, Schweiz
Fieberthermometer	Hartmann, Heidenheim
Filmkassetten	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE Ti	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome® Modul	Zeiss, Oberkochen
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC	Vacuubrand, Wertheim
Folienschweissgerät RAYPACK	Hacona, Ungarn
Gassicherheitsbrenner flammy S	Schütt, Göttingen
Geldokumentationssystem Intas	INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen
Gelelektrophorese/Western Blot Kammer	Bio-Rad Lab., USA
Gelelektrophoresekammer horizontal	Feinmechanik, FLI Tübingen
Glasgefäße	Schott, Mainz
Glasplatten Mini-Protean System	Bio-Rad Lab., USA
Hämatologie-Automat Sysmex xt 2000i	Sysmex, Norderstedt
Heizlüfter Astron 2001	Sprenger, St. Andreasberg
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Heizmagnetrührer Icamag Ret-GS	IKA Labortechnik, Staufen
Inkubator B5050	Heraeus, Hanau
Invertmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
King Fischer 96 Flex Arbeitsstation	Thermo Scientific, Langenselbold
Kühlfalle	Bachhofer, Reutlingen
Kühlschrank Liebherr	Liebherr, Ochsenhausen
Kühltischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Minifuge 2	Heraeus, Hanau
Multifuge X1R	Heraeus, Hanau
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop 2000	peqlab, Erlangen
PCR FlexCycler2	JenaAnalytik, Jena
pH-Meter Calcimetric	Knick, Berlin

Pipetten (Einkanal / 12-Kanal)	Eppendorf, Hamburg Gilson, Frankreich Abimed, Langenfeld INTEGRA Biosciences AG, Schweiz
Pipettierhilfe Pipetboy 2	Konica, Hohenbrunn
QX-70 Röntgenfilmentwickler	Bio-Rad Lab., USA
Realtime Cycler CFX96	New Brunswick Scientific, UK
Schüttelinkubator G25	Infors HT, Einsbach
Schüttelinkubator Multitron	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schütteltisch The Belly Dancer	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Bachhofer, Reutlingen
Speed Vac Concentrator (Savant)	Pharmacia Biotech, England
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Berner International, Elmshorn
Sterilbank FlowSafe® B-[MaxPro]2 – 130	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilbank Safe2020	Hoefer, USA
Stromquelle PS500XT	Mitsubishi, Japan
Thermodrucker P93D	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühlschrank Liebherr (-20°C)	Heraeus, Hanau
Tiefkühltruhe Heraeus (-70°C)	Vetter, Ammerbuch
Transilluminator (302 nm)	Conrad, Hirschau
Triple Timer	Kurt Migge Laborbedarf, Heidelberg
UV-Lampe UV-12	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Vibrofix VF1	Mettler, Gießen
Waage Mettler PM2000	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad HAAKE D8	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3	Tecnomara, Fernwald
Wippschüttler Rockomat	Hecht, Sondheim
Zählkammer, Fuchs-Rosenthal	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg

1.2. Chemikalien

1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (40%)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, München
Ammoniumpersulphat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Becton Dickinson, USA

Biotin	Merck, Darmstadt
Blasticidin	InvivoGen, Frankreich
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-2-hydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane)	Sigma, München
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Serva, Heidelberg
DCS (Donor Calf Serum)	Harmon Technological, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Amersham Biosciences, Freiburg
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
GelRedTM	Biotrend, Köln
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Fluka, Steinheim
Glyoxal (40 %)	Fluka, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Heparin	Serva, Heidelberg
HiDiTM	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Riedel-de-Haën, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck, Darmstadt
L-Alanin	Fluka, Steinheim
L-Asparaginsäure	Fluka, Steinheim
L-Glutaminsäure	Fluka, Steinheim
L-Prolin	Fluka, Steinheim
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Serva, Heidelberg
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Fluka, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NEBuffer 1	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 1.1	New England Biolabs, Schwalbach

NEBuffer 2	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 2.1	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 3.1	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer CutSmart	New England Biolabs, Schwalbach
Nukleosidtriphosphat (Ultrapure dNTP Set)	Pharmacia Biotech, USA
Orange G	Fluka, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin G	Grünenthal, Aachen
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Phenol	Qbiogene, Frankreich
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Polyuridylic Acid	Pharmacia Biotech, USA
Salzsäure (HCl)	Riedel-de-Haën, Seelze
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin	Sanavita, Werne
TEMED	Sigma, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA (25%)	gibco®, Invitrogen, Karlsruhe
Türk Lösung	Merck, Darmstadt
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Steinheim

1.3. Medien, Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser aus einer Millipore Anlage angesetzt.

Aceton-Methanol	50 % (w/v) Aceton 50 % (w/v) Methanol
Antibiotikastammlösung	1 Mio I.U. Penicillin 1000 mg Streptomycin
APS-Lösung	10% APS
Blockpuffer (Western Blot)	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS- Tween

BSA-Lösung	2% (w/v) BSA in PBS
CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin 10 mM Pipes (pH 7,1)
DMEM(+)	50 ml FCS 1 ml Antibiotikastammlösung 500ml DMEM (1x)
DMEM(-)	1ml Antibiotikastammlösung 500 ml DMEM (1x)
DNA-Probenpuffer (5x)	0,125% (w/v) Orange G 15% (w/v) Ficoll 400 5x TAE
dNTP-Mix (50x)	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Erythrosin B-Lösung	10 mg Erythrosin B auf 10 ml PBS
FR-Puffer	0,125% (w/v) Orange G 15 % (w/v) Ficoll400 5% TAE
GelRed-Lösung	0,03 % (w/v) GelRed 0,1 M NaCl
Glyoxallösung	8,8 M Glyoxal entionisiert
Jagow-Anodenpuffer (10x)	2 M Tris pH 8,9
Jagow-Gelpuffer (3X)	3 M Tris pH 8,45 0,3% (w/v) SDS
Jagow-Kathodenpuffer (10x)	1 M Tris pH 8,25 1 M Tricin 1 % (w/v) SDS
Lämmli-Puffer (10x)	0,25 M Tris pH 8,3 1,925 M Glycin

LB++-Medium	10 mM KCl 20 mM MgSO ₄ in LB-Medium
LB-Agar	15 g/l Bacto™ Agar in LB-Medium
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Yeast-Extrakt 5 g NaCl ad 1L H ₂ O
LB-Medium +Amp	100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
Lysispuffer	154 mM NH ₄ Cl 7,3 mM KHCO ₃ 1,3 mM EDTA
Minipröp Solution 1	50 mM Tris pH 8 10 mM EDTA 50 mM Glucose
Minipröp Solution 2	0,2 M NaOH 1 % (v/v) Triton X-100
Minipröp Solution 3	3 M NaAc pH 4,8
Mowiol-Eindeckelmedium	2,4 g Mowiol 6,0 g Glycerol 6 ml H ₂ O 12 ml Tris-Puffer 0,2 M pH 8 0,10% DABCO 2% DAPI (100µg/µl in PBS)
PBS	0,4 mM MgCl ₂ •6H ₂ O 0,9 mM CaCl ₂ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-A	137 mM NaCL 2,7 mM KCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₂ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	0,01 % (v/v) Tween-20 in PBS

PFA-Lösung	4 % (w/v)	Paraformaldehyd in PBS
Saponin-Stammlösung	5% (w/v)	Saponin in PBS-A
SDS-Probenpuffer	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	10 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin (87 %)
	15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,012 % (w/v)	Bromphenolblau
Strip Puffer (pH 2,2)	15 g	Glycin
	1 g	SDS
	10 ml	Tween20
	ad 1L	H ₂ O
TAE-Puffer (50x)	40 mM	Tris pH 7,8
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
TBS-T	50 mM	Tris.HCl, pH 7,4
	150mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween-20
TE-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
Transferpuffer	18 % (v/v)	Methanol in Lämmli-puffer
ZB5(+)	50 ml	FCS
	1 ml	Antibiotikastammlösung
	500ml	ZB5 (1x)
ZB5(-)	1 ml	Antibiotikastammlösung
	500ml	ZB5 (1x)

1.4. Vorgefertigte Koplettsysteme

BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
IDEXX CSFV Ab Test	IDEXX, USA
MagAttract Mini M48 Kit	Quiagen, Hilden
Nucleobond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Düren
OneStep RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
peqGold Trifast™	peqLab, Erlangen
Quantitect Probe RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
RiboMAX™ Large Scale RNA Production	Promega, USA

System – T7

Super Script III One Step RT-PCR	Invitrogen, USA
SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, USA
TRIzol® Reagent	Ambion, Life Technologies, USA

1.5. Enzyme, Proteine und Größenmarker

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche, Mannheim
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Phusion Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
	Fermentas, St. Leon-Rot
	Stratagen, Heidelberg
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Lipofectamine 2000	Invitrogen, USA
1 kb Plus DNA Marker	Invitrogen, USA
PageRuler™ prestained protein standard	Fermentas, St. Leon Rot

1.6. Synthetische Oligonukleotide

Die für PCRs jeglicher Art verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (München) bezogen. Diese wurden frei von Schutzgruppen, voll entsalzt und lyophilisiert geliefert. Aus diesen wurde mit sterilem demineralisiertem Wasser eine Stammlösung gefertigt, mit der die Gebrauchsverdünnungen für PCRs (10pmol/ µl) und Sequenzierung (2,5 pmol/µl) erstellt wurden. Aufgelistet sind die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide, deren Verwendung und die resultierenden Plasmide angegeben.

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
Alfort-NS3	TACCATGGGGCCAGCTGTTTGCAAG	PCR-Primer für NS3-Insert in pAT2/ mit NcoI Schnittstelle
Alfort-NS3rev	AGTCTAGATCATAGACCAACCACCTGTTTTAGTGC	PCR-Primer für NS3-Insert in pAT2/ mit XbaI Schnittstelle
AT1-pCITErev	GCGAGGAAGCGGAAGAGCGC	Sequenzierung / PCR
AT2-CP7_NS3	GGGTTAATTCGAGCTTGGC	Sequenzierung
AT3-Alfort_NS3	GCGTAATCATGGTCATAGC	Sequenzierung
AT4_CP7-NS3	TGCCATGGGAAAAATTCACAG	PCR-Primer für Insert in pAT15 & pAT19 / mit NcoI Schnittstelle
AT5_CP7-NS3	TGCCATGGCGGGGTAAAGATCCC	PCR-Primer für Insert in pAT16/mit NcoI Schnittstelle
AT6_CP7-NS3	TGCCATGGAGTCAGGGGTAACGC	PCR-Primer für Insert in pAT17/ mit NcoI Schnittstelle
AT7_CP7-NS3rev	CATAGTGCTAGCCCTTGACCCGG	PCR-Primer für Insert in pAT18 & pAT19/ mit NheI Schnittstelle
AT8.2	TAATACCATGGCAGGGTCAGTAACCACAAC	Primer für Fusions-PCR
AT9r.2	TGACCCTGCCATGGTATTATCATCGTGTTTTCA	Deletion #1 im verkürzten NS3 / pAT20
AT12.2	CCCTGAGGTAGAGGAGATGAAGGGTAAC	Primer für Fusions-PCR /
AT13r.2	TCCTCTACCTCAGGGGCTATGAATTCTTCTATTG	Deletion #3 in NS3 / pAT21 & pAT38
AT16.2	CAGTTGAACCAGCTAACTGAGAGTGGTAAC	Primer für Fusions-PCR /
AT17r.2	TTAGCTGGTTCAACTGCCATGTTCTCG	Deletion #5 in pAT22 & pAT32
AT20.2	ATGCCATCAAGAGGGTGAGGGTGTCTTC	Primer für Fusions-PCR /
AT21r.2	CACCCTCTTGATGGCATTAGTGGCTACC	Deletion #7 in pAT23 & pAT34
AT24.2	AATGGCTTATTATAGAAGTCAGGAAACAGCAACC	Primer für Fusions-PCR /
AT25r.2	TCTATAATAAGCCATTCTCTTAAGGCCTG	20AS Deletion # 9 in pAT24 & pAT47
AT10.2	CACCCCAGTGATGAAAGGGGAGGACC	Primer für Fusions-PCR /
AT11.2r	CTTTCATCACTGGGGTGGCAGTCATG	Deletion #2 in pAT25 & pAT31
AT22.2	GAAATGTGAGGTCACTGTGGGCGAACAG	Primer für Fusions-PCR /

AT23.2r	CAGTGACCTCACATTTTCAGACCTGTGTCA	Deletion #8 in pAT26 & pAT35
AT14.2	GATCCCTGTAGCCAAGAACTAAAAGCCAAGG	Primer für Fusions-PCR /
AT15.2r	CTTGGCTACAGGGATCTTTAACCCCGCTATG	Deletion #4 in pAT27 & pAT36
AT18.2	GGAAGACGAGTCAGGGGTAACGCTG	Primer für Fusions-PCR /
AT19.2r	CCTGACTCGTCTTCCCCACTGTAGTAATACC	Deletion #6 in pAT28 & pAT33
AT26.2	CCGGTAGGTAGAGTCGATCGACCTGC	Primer für Fusions-PCR /
AT27.2r	CGACTCTACCTACCGGGTTTCACTCTAC	Deletion #10 in pAT29
AT8.4	CTGTTATAGCAGGGTCAGTAACCACAAC	Primer für Fusions-PCR /
AT9.4R	GACCCTGCTATAACAGCCAAGTCTCAGG	Deletion #1 in pAT39
AT26.5	CGGTAGGGACTACCACTATGACTTGTTACAGG	Primer für Fusions-PCR /
AT27.5R	TGGTAGTCCCTACCGGGTTTCACTCTAC	Deletion #10 in pAT43
AT28.2	CGGTAGGGCACAGAGGTACGGGATC	Primer für Fusions-PCR /
AT29.R	CTCTGTGCCCTACCGGGTTTCACTCTAC	Deletion # 11in pAT48
AT_55	ACTGCCACCCCAGCAGCGGCAGCAGCCACAACAGGGCAA	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_56R	TTGCCCTGTTGTGGCTGCTGCCGCTGCTGGGGTGGCAGT	Alaninpentamersubstitution #5 in pAT52
AT_57	CAGGGTCAGTAACCGCAGCAGCGGCAGCACACCCAA TAGAAGAATTC	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_58R	GAATTCTTCTATTGGGTGTGCTGCCGCTGCTGCGGTTACTGACC	Alaninpentamersubstitution #6 in pAT53
AT_59	CAGGGCAAAAAGCCGCAGCAGCAGCATTCATAGCCCCTGAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_60R	CTCAGGGGCTATGAATGCTGCTGCTGCGGCTTTTTGCCTG	Alaninpentamersubstitution #7 in pAT58
AT_61	CAATAGAAGAAGCCGCAGCCGCTGCGGTGATGAAAGGGGAGG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_62R	CCTCCCCTTTTCATCACCGCAGCGGCTGCGGCTTCTTCTATTG	Alaninpentamersubstitution #8 in pAT57
AT_63	CATAGCCCCTGAGGCGGCGGCAGCGGCGGACCTTGGAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_64R	CTTCCAAGGTCCGCCGCTGCCGCCGCTCAGGGGCTATG	Alaninpentamersubstitution #9 in pAT63
AT_65	GAAAGGGGAGGCCGCTGCAGCCGCTTCCTTGACATAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_66R	CTATGTCAAGGAACGCGGCTGCAGCGGCCTCCCCTTTC	Alaninpentamersubstitution #10 in pAT64
AT_67	CTTGGAAGCCAGGCCGCTGCCGCAGCGGGGTAAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_68R	CTTTAACCCCGCTGCGGCAGCGGCCTGGCTTCCAAG	Alaninpentamersubstitution #11 in pAT65
AT_69	GGGCAAAAAGCCGCAATAGAAGAATTC	Mutageneseprimer QC-PCR/

AT_70R	GAATTCTTCTATTGCGGCTTTTGGCC	Alanindoppelsubstitut ion #7.1 in pAT68
AT_71	CAAAAACACCCAGCAGCAGAATTCATAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_72R	CTATGAATTCTGCTGCTGGGTGTTTTG	Alanindoppelsubstitut ion #7.2 in pAT69
AT_73	CCAATAGAAGCAGCTATAGCCCCTG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_74R	CAGGGGCTATAGCTGCTTCTATTGG	Alanindoppelsubstitut ion #7.3 in pAT82
AT_75	ATAGAAGAATTCGCAGCCCCTGAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_76R	CTCAGGGGCTGCGAATTCTTCTAT	Alanindoppelsubstitut ion #8.2 in pAT70
AT_77	GAATTCATAGCCGCTGCGGTGATGAAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_78R	CTTTCATCACCGCAGCGGCTATGAATTC	Alanindoppelsubstitut ion #8.3 in pAT71
AT_79	GGGAGGACGCTGCAAGCCAGTTCC	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_80R	GGAAGTGGCTTGCAAGCTCTCCC	Alanindoppelsubstitut ion #10.2 in pAT72
AT_81	GACCTTGGAGCCGCGTTCCTTGAC	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_82R	GTCAAGGAACGCGGCTCCAAGGTC	Alanindoppelsubstitut ion #10.3 in pAT75
AT_83	GGAAGCCAGGCCGCTGACATAGCG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_84R	CGCTATGTCAGCGGCTGGCTTCC	Alanindoppelsubstitut ion #11.1 in pAT73
AT_85	CAGTTCCTTGCCGAGCGGGGTAAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_86R	CTTTAACCCCGCTGCGGCAAGGAAGT	Alanindoppelsubstitut ion #11.2 in pAT76
AT_95	GAGGTGATGGCAGCGGAGGACCTTG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_96R	CAAGGTCCTCCGCTGCCATCACCTC	Alanindoppelsubstitut ion #9.2 in pAT84
AT_97	GTGATGAAAGGGCGGCCCTTGGAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_98R	CTTCCAAGGGCCGCCCTTTCATCAC	Alanindoppelsubstitut ion #9.3 in pAT83
AT_103	GGAATTTATAGCCGCGGCAGTGATGAAAGG	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_104R	CCTTTCATCACTGCCGCGGCTATAAATTCC	Alanindoppelsubstitut ion #8.3 in pAT87
AT_105	GCCCCTGAGGCGGCGAAAGGGGAGGAC	Mutageneseprimer QC-PCR/
AT_106R	GTCCTCCCCTTTCGCCGCTCAGGGGC	Alanindoppelsubstitut ion #9.1 in pAT89
AT_107	TACCATGGGGCCAGCCGTGTG	PCR-Primer NY'93 NS3 mit NcoI Schnittstelle

AT_108R	AGTCTAGATCATAAGCCAGTTACTTGTTTTAATGC	PCR-Primer NY'93 NS3 mit XbaI Schnittstelle
AT_109	GAGTTCATAGCCGCAGCGATGAAAGGTG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV NY'93
AT_110R	CACCTTTCATCGCTGCGGCTATGAACTC	Alanindoppelsubstitution #8.3 Δ V in pAT103
AT_111	GAAAGGTGAAGATGCAGCTAGTGAATACTTGG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV NY'93
AT_112R	CCAAGTATTCAGCTAGCTGCATCTTCACCTTTC	Alanindoppelsubstitution #10.2 in pAT102
AT_113	GAAAGGAGAAGACGCGGCTTCTGAGTACTTAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_114R	CTAAGTACTCAGAAGCCGCGTCTTCTCCTTTC	Alanindoppelsubstitution #10.2 in pAT95
AT_117	GGAATTCATAGCTGCTGCGGTGATGAAAGG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV KE9
AT_118R	CCTTTCATCACCGCAGCAGCTATGAATTCC	Alanindoppelsubstitution #8.3 in pAT 100
AT_119	GAAAGGGGAGGACGCTGCTAGCCAGTTCCTTG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV KE9
AT_120R	CAAGGAACTGGCTAGCAGCGTCCTCCCCTTTC	Alanindoppelsubstitution #10.2 in pAT 101
AT_121	GAGTTTATAGCCGCAGCGGTAATGAAGGGTG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_122R	CACCCTTCATTACCGCTGCGGCTATAAACTC	Alanindoppelsubstitution #8.3 in pAT94
AT_123	GAAGGGTGAAGATGCAGCAAGTGAATACTTGG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_124R	CCAAGTATTCAGTGTGCTGCATCTTCACCCTTC	Alanindoppelsubstitution #10.2 in pAT99
AT_125	CATAGCCCCTGAGGACCTTGGAAGCCAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV CP7
AT_126R	CTGGCTTCCAAGGTCCTCAGGGGCTATG	Pentamerdeletion #9 in pAT115
AT_127	CAGCAACCCAGCTGCGGCGGCCGCGACGACTGGTCAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_128R	CTGACCAGTCGTCGCGGCCGCCGAGCTGGGGTTGTG	Alaninpentamersubstitution #5 in pAT106
AT_129	CACGGTCACGGCGGCTGCTGCGGCACACCCTATAGAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_130R	CTCTATAGGGTGTGCCGCAGCAGCCGCGTGACCGTG	Alaninpentamersubstitution #6 in pAT107
AT_131	CTGGTCAGAAAGCCGCTGCAGCGGCGTTTATAGCCCCAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_132R	CTGGGGCTATAAACGCCGCTGCAGCGGCTTTCTGACCAG	Alaninpentamersubstitution #7 in pAT121
AT_133	CTATAGAGGAGGCTGCAGCCGCAGCGGTAATGAAGGTG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_134R	CACCCTTCATTACCGCTGCGGCTGCAGCCTCCTCTATAG	Alaninpentamersubstitution #8 in pAT117
AT_135	TAGCCCCAGAGGCAGCGGCGGCTGCAGATCTAGGAA GTG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296

AT_136R	CACTTCCTAGATCTGCAGCCGCCGCTGCCTCTGGGGC TA	Alaninpentamersubsti tution #9 in pAT110
AT_137	GAAGGGTGAAGCTGCAGCAGCTGCATACTTGGATAT TG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_138R	CAATATCCAAGTATGCAGCTGCTGCAGCTTCACCCTTC	Alaninpentamersubsti tution #10 in pAT122
AT_139	CTAGGAAGTGAAGCCGCGGCTGCTGCAGGGCTGAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_140R	CTTCAGCCCTGCAGCAGCCGCGGCTTCACTTCCTAG	Alaninpentamersubsti tution #11 in pAT111
AT_141	TGGATATTGCAGCGGCGGCGGCAGCAACTGAAGAGA TG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV 296
AT_142R	CATCTCTTCAGTTGCTGCCGCCGCCGCTGCAATATCCA	Alaninpentamersubsti tution #12 in pAT108
AT_143	CAGCGACACCGGCAGCCGCAGCAGCAACCACTGGGC AG	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_144R	CTGCCCAGTGGTTGCTGCTGCGGCTGCCGGTGTGCT G	Alaninpentamersubsti tution #5 in pAT124
AT_145	GGCACAGTAACAGCCGCTGCGGCGGCACACCCTATA G	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_146R	CTATAGGGTGTGCCGCCGAGCGGCTGTTACTGTGCC	Alaninpentamersubsti tution #6 in pAT119
AT_149	CTATAGAGGAAGCTGCAGCCGCGGCAGTGATGAAAG G	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_150R	CCTTTCATCACTGCCGCGGCTGCAGCTTCCTCTATAG	Alaninpentamersubsti tution #8 in pAT112
AT_151	TTATAGCCCCGGAAGCGGCGGCAGCAGCAGACTTGG GTTC	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_152R	GAACCCAAGTCTGCTGCTGCCGCCGCTTCCGGGGCTA TAA	Alaninpentamersubsti tution #9 in pAT114
AT_153	GATGAAAGGAGAAGCCGCGGCTGCTGCGTACTTAGA TATTGC	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_154R	GCAATATCTAAGTACGCAGCAGCCGCGGCTTCTCCTT TCATC	Alaninpentamersubsti tution #10 in pAT109
AT_155	CTTGGGTTCTGAGGCCGCAGCTGCTGCCGGAAGTAA GATAC	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_156R	GTATCTTCAGTCCGGCAGCAGCTGCGGCCTCAGAACC CAAG	Alaninpentamersubsti tution #11 in pAT113
AT_157	CTTAGATATTGCCGCAGCGGCGGCAGCAGTAGAGGA GATG	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_158R	CATCTCCTCTACTGCTGCCGCCGCTGCGGCAATATCTA AG	Alaninpentamersubsti tution #12 in pAT126
AT_161	GGAGTTCATAGCCGCAGCGGTGATGAAAG	Mutageneseprimer QC-PCR/ BVDV NY'93
AT_162R	CTTTCATCACCGCTGCGGCTATGAACTCC	Alanindoppelsubstit ution #8.3 in pAT118
AT_163	CTGGGCAGAAAGCCGCTGCGGCGGCATTTATAGCCC CG	Mutageneseprimer QC-PCR/ CSFV A/T
AT_164R	CGGGGCTATAAATGCCGCCGAGCGGCTTCTGCCCA G	Alaninpentamersubsti tution #7 in pAT125
B23J	GATCTATTGGTCTGTGACAG	Sequenzierung
B25II	AATGAGTGGTATCCAACTG	Sequenzierung

B30r	TTTGA CTCTGCCAACCAC	Sequenzierung
BT433	GTCCTGATACCAT TGAGAG	Sequenzierung
C5650 -	TCAAATATCGGTAGCCCTGACCAGCC	Sequenzierung
CP7-NS3	TACCATGGGACCTGCCGTGTGCAAG	PCR-Primer für NS3-Insert in pAT1/ mit NcoI Schnittstelle
CP7-NS3rev	AGCTAGATCACAGTCCTACCACTTGCTTCAGTG	PCR-Primer für NS3-Insert in pAT1/ mit XbaI Schnittstelle
CSFV 9	CGGACAGGGTTGTTTG	Sequenzierung
E03SXba I	GCCTAGACTAGGCATAGGCACCAAACCAGGTTTTGC	Sequenzierung
E05S III	CATGCCATGGGGGCCCTGTTGGCTTGGGCGGTG	Sequenzierung
EMCV f	GAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGC	Sequenzierung / PCR
IB80rev	AGGGAGTGCGCATGCCGGGTGCAGTTGTT	Sequenzierung/ RT-PCR
IB95	CTCCTCGGTCTCGATTCTACGGAGAAGGACAGCAAGA CC	Sequenzierung/ RT-PCR
pCite	CGGGGACGTGGTTTTCTTT	PCR
pCITErev	CAGCTATGACCATGATTACG	Sequenzierung /PCR
pCITEseq	CGGGGACGTGGTTTTCTTTG	Sequenzierung
348M+	AACAAACATGGARCGTGTA ACTGGTAC	Sequenzierung
53II	AGGTGAGATGAAGGAAGGTG	Sequenzierung

1.7. Plasmide

Zur Kartierung des Epitops des mAk Code4 im NS3 wurden NS3-Expressionsplasmide generiert. Alle Expressionsplasmide basieren auf dem Expressionsvektor pCITE2a, in den die NS3-Sequenz der verschiedenen Stämme eingefügt wurde. Die einzelnen Veränderungen zur Untersuchung des NS3 eingeführten Veränderungen wurden von den parental Plasmiden über verschiedene Klonierungsmethoden, wie z.B. durch gezielte PCR gestützte Mutagenese oder Restriktionsenzymspaltung und Religation des Plasmides zur Deletion ganzer Sequenzabschnitte. Abbildung 3 zeigt beispielhaft für alle Expressionsplasmide die Vektorkarte des Grundplasmids pAT1.

Um die Veränderungen im Kontext des viralen Genoms zu untersuchen wurde ein Zwischenklon etabliert. Über diesen Zwischenschritt konnte die gewünschte Veränderung in den infektiösen Gesamtklon eingebracht werden.

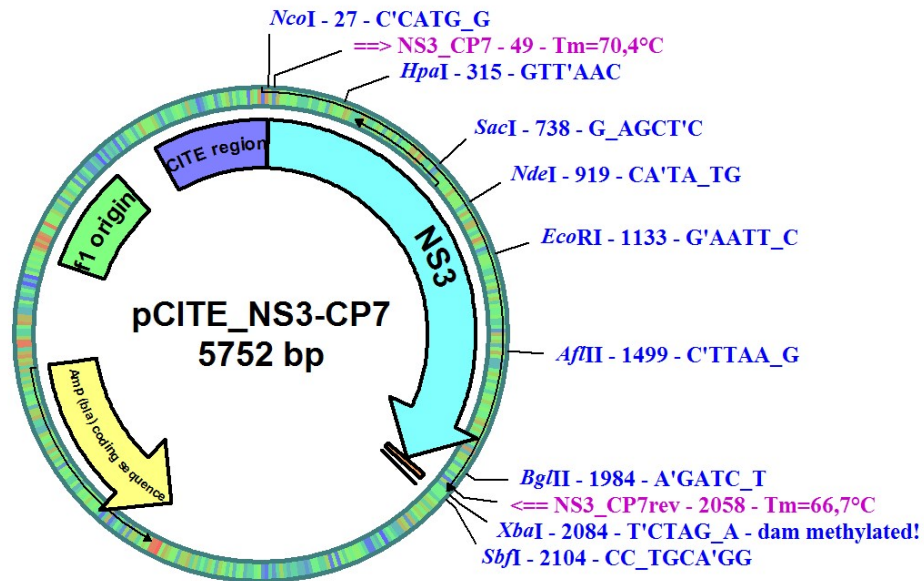


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung eines NS3-Expressionsplasmids anhand pAT1. Expressionsplasmid auf Basis von pCITE2a.

Die Expression steht unter Kontrolle des T7-Promotors und wird durch die CITE-Region (ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) aus dem EMCV-Genom) vermittelt. Mit Oligonukleotiden (incl. Restriktionsenzymerkennungssequenz) wurde das einzubringende Fragment amplifiziert, mit den entsprechenden Enzymen gespalten und in den entsprechend vorbereiteten Vektor inseriert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden in Magenta angegeben. Die zur Klonierung des parentalen Vektors pAT1 verwendeten Enzyme *NcoI* und *XbaI* sowie die Enzymschnittstellen, die für die Deletionen in den von pAT1

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Plasmid-bezeichnung	Ausgangs-plasmid	Insert/Veränderung (Template;Enzyme)
pCITE2a		kommerziell erworbenes DNA-Expressionsplasmid mit T7-Promotor und EMCV-IRES
Plasmide BVDV CP7		
p789		CP7 Gesamtklon (bereits im Labor vorhanden)
pAT1	pCITE2A	PCR: CP7 NS3 (798;NcoI/XbaI)
BVDV CP7 Deletionsbibliothek		
pAT3	pAT1	Deletion über RE: SdaI/EcoRI
pAT4	pAT1	Deletion über RE: SdaI/NdeI
pAT5	pAT1	Deletion über RE: SdaI/SacI
pAT6	pAT1	Deletion über RE: SdaI/HpaI
pAT11	pAT1	Deletion über RE: SdaI/BglII
pAT12	pAT1	Deletion über RE: SdaI/AflII
pAT14	pAT1	Deletion über RE: NcoI/NdeI
pAT15	pAT1	Insertion PCR-Fragment: AT4/CP7_NS3 rev (pAT1; NcoI/XbaI)
pAT16	pAT1	Insertion PCR-Fragment CP7 AT5/CP7NS3 rev (pAT1; NcoI/XbaI)
pAT17	pAT1	Insertion PCR-Fragment CP7 AT6/CP7NS3 rev (pAT1; NcoI/XbaI)
pAT18	pAT1	Insertion PCR-Fragment CP7 CP7NS3 /AT7rev (pAT1; NcoI/NheI)
pAT19	pAT1	Insertion PCR-Fragment pAT1 /AT4/AT7rev (pAT1; NcoI/NheI)
Interne 20AS Deletion im verkürzten NS3		
pAT20	pAT19	F-PCR: Δ1 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT21	pAT19	F-PCR: Δ2 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT22	pAT19	F-PCR: Δ3 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT23	pAT19	F-PCR: Δ4 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT24	pAT19	F-PCR: Δ5 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT25	pAT19	F-PCR: Δ6 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT26	pAT19	F-PCR: Δ7 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT27	pAT19	F-PCR: Δ8 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT28	pAT19	F-PCR: Δ9 (pAT19; NcoI/SphI)
pAT29	pAT19	F-PCR: Δ10 (pAT19; NcoI/SphI)
Interne 20AS Deletion im NS3		
pAT31	pAT1	F-PCR: Δ2 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT32	pAT1	F-PCR: Δ5 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT33	pAT1	F-PCR: Δ6 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT34	pAT1	F-PCR: Δ7 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT35	pAT1	F-PCR: Δ8 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT36	pAT1	F-PCR: Δ4 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT38	pAT1	F-PCR: Δ3 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT39	pAT1	F-PCR: Δ1 (pAT1;NcoI/SphI)
pAT43	pAT1	F-PCR: Δ10 (pAT1;NcoI/SphI)

pAT47	pAT1	F-PCR: $\Delta 9$ (pAT1;NcoI/SphI)
pAT48	pAT1	F-PCR: $\Delta 11$ (pAT1;NcoI/SphI)
Pentamerdeletion		
pAT116	pAT1	F-PCR/ Pentamerdeletion $\Delta 9$
Alaninsubstitutionen		
pAT52	pAT1	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #5
pAT53	pAT1	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #6
pAT57	pAT1	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #8
pAT58	pAT1	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #7
pAT63	pAT1	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #9
pAT64	pAT1	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #10
pAT65	pAT1	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #11
pAT68	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 7.1
pAT69	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 7.2
pAT70	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.2
pAT71	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.3
pAT72	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.2
pAT73	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 11.1
pAT75	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.3
pAT76	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 11.2
pAT82	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 7.3
pAT83	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 9.3
pAT84	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 9.2
pAT89	pAT1	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 9.1
selbsgenerierte BVDV CP7 Zwischenklone & Gesamtklone		
pAT90	pCITE 2a	PCR (798; NcoI/Sall)
pAT91	pAT90	pAT71 (AflII/NdeI)
pAT92	798	pAT91 (NcoI/Sall)
Plasmide CSFV Alfort/Tübingen		
p1347 RTF		CSFV Alfort/Tübingen Gesamtklon (bereits im Labor vorhanden)
pAT2	pCITE2a	Alfort_NS3 (1347 RTF; NcoI/XbaI)
CSFV Alfort/Tübingen Deletionsbibliothek		
pAT7	pAT2	Deletion über RE: SdaI/EcoRV
pAT8	pAT2	Deletion über RE: SdaI/Sall
pAT9	pAT2	Deletion über RE: SdaI/AflII
pAT10	pAT2	Deletion über RE: SdaI/EcoRI
pAT13	pAT2	Deletion über RE: NcoI/BstZ17I
Alaninsubstitutionen		
pAT87	pAT2	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.3
pAT95	pAT2	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.2
pAT109	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #10
pAT110	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #9
pAT112	pAT2	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #8
pAT113	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #11
pAT114	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #9
pAT119	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #6

pAT124	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #5
pAT125	pAT2	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #7
pAT126	pAT2	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #12
Plasmide BVDV 296		
pB427		BVDV 296 NS3 Expressionsplasmid (zur Verfügung gestellt von B.A.Tews)
Alaninsubstitutionen		
pAT94	pB427	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.3
pAT99	pB427	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.2
pAT106	pB427	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #5
pAT107	pB427	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #6
pAT108	pB427	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #12
pAT111	pB427	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #11
pAT117	pB427	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #8
pAT121	pB427	QC-PCR/Alaninpentamersubstitution #7
pAT122	pB427	QC-PCR/ Alaninpentamersubstitution #10
Plasmide BVDV KE9		
p1678		BVDV NY'93 Klon (bereits im Labor vorhanden)
pAT93	pCITE 2a	KE9 NS3 PCR (1678;NcoI/XbaI)
Alaninsubstitutionen		
pAT100	pAT 93	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.3
pAT101	pAT 93	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.2
Plasmide BVDV NY'93		
PK40A		NY'96 Klon (bereits im Labor vorhanden)
pAT96	pCITE 2a	NY'93 NS3 (PK40A; NcoI/XbaI)
Alaninsubstitutionen		
pAT102	pAT96	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 10.2
pAT103	pAT96	QC 8.3ΔV / Alanindoppelsubstitution 8.3
pAT118	pAT96	QC-PCR/ Alanindoppelsubstitution 8.3

Die folgende Liste zeigt die eingeführten Veränderungen der Aminosäuresequenz der einzelnen NS3-Fragmente. Die Nummerierung bezieht sich auf das jeweilige parentale NS3-Expressionsplasmid (BVDV CP7 – pAT1; CSFV A/T – pAT2; BVDV 296 – pB427; BVDV KE9 – pAT93 und BVDV NY'93 – pAT96). Die Lokalisation der angegebenen Sequenz im Polyprotein (PP) bezieht sich auf die jeweils angegebene Referenz (incl. GenBank Zugriffsschlüssel). Striche symbolisieren Deletionen, Substitutionen wurden jeweils hervorgehoben.

AS-Sequenz (Nummerierung bezogen auf das parentale NS3- Expressionsplasmid)		Lokalisation der angegebenen Sequenz im Polyprotein
Plasmide BVDV CP7		Referenzsequenz: AAC55975 CP7
pAT1	1GPAVCKKI[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa633-1315
BVDV CP7 Deletionsbibliothek		
pAT3	1GPAVCKKI[...]GQKHPIEE ₃₆₉	aa 633-1000
pAT4	1GPAVCKKI[...]ATGITYAS ₂₉₆	aa 633-928
pAT5	1GPAVCKKI[...]ATGAGKTT ₂₃₄	aa 633-866
pAT6	1GPAVCKKI[...]VCQSNK ₉₅	aa 633-727
pAT11	1GPAVCKKI[...]VYATEDED ₆₅₂	aa 633-1284
pAT12	1GPAVCKKI[...]PFIVTGLK ₄₉₁	aa 633-1123
pAT14	297YGYFCQMP[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 929-1315
pAT15	335GKIHRFSE[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 967-1315
pAT16	388AGLKIPVE[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 1020-1315
pAT17	455ESGVTLPD[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 1087-1315
pAT18	1GPAVCKKI[...]QETATGSK ₅₂₆	aa 633-1158
pAT19	335GKIHRFSE[...]QETATGSK ₅₂₆	aa 967-1158
Interne 20AS Deletion im verkürzten NS3		
pAT20	335-----AGSVTTTG ₃₆₁	aa 967-993
pAT21	366IEEFIAPE-----VEEMKGNM ₄₀₁	aa 998-1033
pAT22	406PTRNMAVE-----PANLRVVT ₄₄₁	aa 1038-1073
pAT23	447VVVATNAI-----KRVRVSSK ₄₈₂	aa 1079-1114
pAT24	487VTGLKRMA-----YYRSQETA ₅₂₂	aa 1119-1154
pAT25	346VVAMTATP-----VMKGEDLG ₃₈₁	aa 978-1013
pAT26	467VDTGLKCE-----VTVGEQAQ ₅₀₂	aa 1099-1134
pAT27	386DIAGLKIP-----VAKKLKAK ₄₁₉	aa 1018-1051
pAT28	426GYYYSGED-----ESGVTLPD ₄₆₂	aa 1058-1094
pAT29	508GRVKPGR ₅₁₄ -----528	aa 1140-1159
Interne 20AS Deletion im NS3		
pAT31	346VVAMTATP-----VMKGEDLG ₃₈₁	aa 978-1013
pAT32	406PTRNMAVE-----PANLRVVT ₄₄₁	aa 1038-1073
pAT33	426GYYYSGED-----ESGVTLPD ₄₆₂	aa 1058-1094
pAT34	447VVVATNAI-----KRVRVSSK ₄₈₂	aa 1079-1114
pAT35	467VDTGLKCE-----VTVGEQAQ ₅₀₂	aa 1099-1134
pAT36	386DIAGLKIP-----VAKKLKAK ₄₁₉	aa 1018-1051
pAT38	366IEEFIAPE-----VEEMKGNM ₄₀₁	aa 998-1033
pAT39	327TPEQLAVI-----AGSVTTTG ₃₆₁	aa 959-993
pAT47	487VTGLKRMA-----YYRSQETA ₅₂₂	aa 1119-1154
pAT48	508GRVKPGR-----AQRYGIED ₅₄₂	aa 1140-1174
Pentamerdeletion		
pAT116	366IEEFIAPE-----DLGSQFLD ₃₈₆	aa 998-1018
Alaninsubstitutionen		
pAT52	354AAAAATTGQKHPIEEFIAPEVMKGEDLGSQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT53	354AGSVTAAAAHPIEEFIAPEVMKGEDLGSQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT57	354AGSVTTTGQKHPIEEAAAAVMKGEDLGSQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020

pAT58	354AGSVTTTGQK AAAA FIAPPEVMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT63	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAP AAAA DLGSQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT64	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGE AAAA FLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT65	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSQL AAAA A ₃₈₈	aa 986-1020
pAT68	354AGSVTTTGQK AA IEEFIAPEVMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT69	354AGSVTTTGQKH PA AEFIAPPEVMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT70	354AGSVTTTGQKHPIEEF AA PEVMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT71	354AGSVTTTGQKHPIEEF IAAA VMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT72	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGED AA SQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT73	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSQL AA DIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT75	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLG AA FLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT76	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSQLD AA A ₃₈₈	aa 986-1020
pAT82	354AGSVTTTGQKHPI EA IAPEVMKGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT83	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMK GA ALGSQFLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT84	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAPPEVM AA EDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020
pAT89	354AGSVTTTGQKHPIEEFIAP EA KGEDLGSQLDIA ₃₈₈	aa 986-1020

Referenzsequenz:
AAA43844 CSFV
Alfort/Tübingen

Plasmide CSFV Alfort/Tübingen		
pAT2	1GPAVCKKV[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 1590-2272
CSFV Alfort/Tübingen Deletionsbibliothek		
pAT7	1GPAVCKKV[...]LEILNNLL ₅₇₇	aa 1590-2166
pAT8	1GPAVCKKV[...]LPDLVVV ₄₆₇	aa 1590-2056
pAT9	1GPAVCKKV[...]FFDLKLNK ₁₆₀	aa 1590-1749
pAT10	1GPAVCKKV[...]HLQKTGGE ₁₄₁	aa 1590-1730
pAT13	264YQYMRQKH[...]ALKQVVGL ₆₈₃	aa 1853-2272
Alaninsubstitutionen		
pAT87	354AGTVTTTGQKHPIEEF IAAA VMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT95	354AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGED AA SEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT109	354AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGE AAAAA YLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT112	354AGTVTTTGQKHPIEE AAAAA VMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT113	354AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSE AAAAA AGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT114	354AGTVTTTGQKHPIEEFIAP AAAAA DLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT119	354AGTV AAAAA HPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT124	354 AAAAA TTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT125	354AGTVTTTGQK AAAAA FIAPPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₃₉₃	aa 1943-1982
pAT126	354AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLD IAAAAAA ₃₉₃	aa 1943-1982

Plasmide BVDV 296		
pB427	1GPAVCKKI[...]ALKQVTGL ₆₈₃	
Alaninsubstitutionen		
pAT94	579AGTVTTTGQKHPIEEF IAAA VMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₆₁₈	
pAT99	579AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGED AA SEYLDIAGLKIP ₆₁₈	
pAT106	579 AAAAA TTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₆₁₈	
pAT107	579AGTV AAAAA HPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP ₆₁₈	
pAT108	579AGTVTTTGQKHPIEEFIAPPEVMKGEDLGSEYLD IAAAAAA ₆₁₈	
pAT110	579AGTVTTTGQKHPIEEFIAP AAAAA DLGSEYLDIAGLKIP ₆₁₈	

pAT111 579AGTVTTTGQKHPIEEFIAPEVMKGEDLGSEAAAAAGLKIP₆₁₈
pAT117 579AGTVTTTGQKHPIEEAAAAVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP₆₁₈
pAT121 579AGTVTTTGQKAAAAFIAPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIP₆₁₈
pAT122 579AGTVTTTGQKHPIEEFIAPEVMKGEAAAAAYLDIAGLKIP₆₁₈

Referenzsequenz:
ABK96992 BVDV
KE9

Plasmide BVDV KE9

pAT93 1GPAVCKKI[...]ALKQVVGL₈₆₇ aa 1590-2272

Alaninsubstitutionen

pAT100 538AGSVTTTGQKHPIEEFIAA₅₇₂VMKGEDLGSQLDIA₅₇₂ aa 1943-1977
pAT101 538AGSVTTTGQKHPIEEFIAPEVMKGEDAASQLDIA₅₇₂ aa 1943-1977

Referenzsequenz:
AF502399 BVDV
NY'93

Plasmide BVDV NY'93

pAT96 1GPAVCKKI[...]ALKQVTGL₆₈₃ aa 1604-2286

Alaninsubstitutionen

pAT102 354AGTVTTTGQKHPIEEFIAPEVMKGEDAASEYLDIA₃₈₈ aa 1957-1991
pAT103 354AGTVTTTGQKHPIEEFIAA-MKGEDLGSEYLDIA₃₈₈ aa 1957-1991
pAT118 354AGTVTTTGQKHPIEEFIAA₃₈₈VMKGEDLGSEYLDIA₃₈₈ aa 1957-1991

1.8. Software

Axiovision	Zeiss, Göttingen
CodonCode Aligner	CodonCode Corporation
pDraw32	AcaClone Software
Geneious	Biomatters Ltd., New Zealand
PyMol (Version 0.99rc6)	Schrödinger LLC, Japan

1.9. Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Einmalkanüle Neolus 0,7x30mm	Terumo, Belgien
Einmalkanüle Neolus 1,2 x 50mm	Terumo, Belgien
Einmalkanüle Sterican 0,9x40mm	Braun, Melsungen
Einmalkanüle Sterican 1,2 x 40mm	Braun, Melsungen
Einmalspritzen (1ml, 2ml, 10ml, 20ml, 50ml)	Braun, Melsungen
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Kanülen (27G)	Braun, Melsungen
Messpipetten (Glas)	Becton Dickinson, USA
Mikrofilter (0,45 / 0,2 µm)	Whatman, Dassel
Monovetten EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Monovetten mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Nitrocellulosemembran Whatman Protran BA	GE Healthcare, Solingen
Objektträger Glas	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich
PCR-Gefäße (0,2ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Plastibrand 1,5ml Halbmikroküvetten	Brand, Wertheim
PS-Röhrchen 12ml	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran Imobilon PSQ	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml, 2ml und 5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Nerbe Plus, Winsen
Röntgenfilm CL-XPosure	Thermo Scientific, Langenselbold
Vacuum Filter Systems	Corning Incorporated, USA
Zellkultur-Platte (6- / 24- /96- well)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturschalen 3,5cm Falcon	Corning Incorporated, USA
Zentrifugenröhrchen (15ml; 50ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

1.10. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die Immunfluoreszenz (III.2.1.4,III.2.4.3.2) oder Western Blot Analysen (III.2.4.3.5) in der angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Bezeichnung	Ziel-sequenz	Organismus	Verdün-nung IF	Verdün-nung WB	Herkunft
Polyklonale Antikörper					
A03	NS3	Kaninchen		1:1000-2500	eigene Herstellung
BVDV-Mix	E2	Maus	1:5		Dr. Weiland
monoklonale Antikörper					
a18	E2	Maus	1:10		Dr. Weiland
Code 4	NS3	Maus	1:10	1:10-100	Dr. Dubovi
WB112	NS3	Maus	1:100-150	1:100	APHA scientific, England
sekundäre Antikörper					
αKaninchen-PO	Kaninchen-IgG	Ziege		1:10000	Dianova, Hamburg
αMaus-PO	Maus-IgG	Ziege		1:10000	Dianova, Hamburg

α Maus-FITC	Maus-IgG	Kaninchen	1:100	Jackson Immuno Research Laboratories molecular probes®, Thermo Scientific molecular probes®, Thermo Scientific Dianova, Hamburg
Alexa Fluor®488	Maus-IgG	Ziege	1:250	
Alexa Fluor®488 - IgG2a	Maus-IgG	Ziege	1:250	
Cy3-IgG1	Maus-IgG	Ziege	1:100-250	

1.11. Biologisches Material

1.11.1. Zellen

- BHK-21** Subklon einer adhärenenten Zelllinie, die 1961 aus den Nierenzellen von fünf einen Tag alten Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) gewonnen wurde. Zellen erhalten von T. Rümenapf (Universität Wien)
- MDBK-B2** Subklon einer adhärenenten Zelllinie, die 1957 aus der Niere eines adulten Ochsen (*Bos taurus*) gewonnen wurde. Ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC#: CCL-22).
- SK-6** Adhärenente porcine Nierenzelllinie (*Sus scrofa*). Linie 6 Zellen erhalten von R. Riebe (Zellbank Insel Riems)

1.11.2. Bakterienstämme

Für die Amplifikation der Plasmide wurden die Bakterienstämme *E. coli* K12 HB101 und Top 10 F' verwendet.

- Top 10 F' - Genotyp** mcrA, D(mcrBC-hsdRMS-mrr), end A1, recA1, relA1, gyrA96, F80lacZDM15, deoR, nupG, araD139, F(lacIq, Tn10(Tetr)), galU, DlacX74, galK, D(ara-leu)7697
- HB101 - Genotyp** supE44, Δ (mcrC-mrr), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1

1.11.3. Viren

SP50	CSFV Alfort/Tübingen; Passage 50
1347 RTFIII	CSFV Alfort/Tübingen
1990CIII	CSFV: E ^{rns} Pseudorevertante (C ₁₇₁ S / S ₂₀₉ C)
EP 82/2	CSFV: E ^{rns} dimerisierungsneagtives Virus (C ₁₇₁ S)
EP 798	BVDV CP7
EP pAT92	BVDV: Code4-neagtive CP7-Mutante
Vacciniavirus MVA T7	erhalten von Dr. B Moss

1.12. Versuchstiere

Für die Pathogenitätsstudien wurden Ferkel der Rasse Deutsches Hybridschwein mit einem Einstellungsgewicht von ca. 20 kg bezogen. Diese wurden von zum vom Landwirtschaftsbetrieb e.G. Schwasdorf und der Schweinezucht Alt Gaarz Hohen Wangelin angeliefert.

2. Methoden

2.1. Methoden zur Charakterisierung von Viren

2.1.1. Kultivierung von Zellen

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Zelllinien (SK6, MDBK-B2 & BHK-21, III.1.11.1) wurden routinemäßig mit ZB5 unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS) in 10cm Zellkulturschalen bei 37°C und 7% CO₂ gehalten. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen vereinzelt und ihrem Wachstum entsprechend umgesetzt. Hierfür wurde der Zellrasen (MDBK-B2 & Sk-6), nach einmaligen waschen mit Trypsin (ATV) mit ca. 2ml Trypsin bedeckt und für 2-3min bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden der Schale lösen und vereinzeln ließen. BHK-21 wurden zweimal mit Trypsin gewaschen und anschließend ohne Trypsin oder Medium inkubiert. Die vereinzelteten Zellen wurden in FCS haltigem Medium

(Medium (+)) aufgenommen und in an den Zelltyp angepassten Verdünnungen in neue Schalen ausgesät.

2.1.2. Infektion von Zellen

Zur Generierung neuer Viruspassagen und deren Charakterisierung wurden jeweils am Vortag Zellen eingesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion ca. 60% Konfluenz aufwiesen. Vor Infektion wurden die Zellen mit FCS freiem Medium (Medium(-)) gewaschen. Nach schonendem Auftauen auf Eis wurde die verwendete Viruspassage resuspendiert und eine Virus-Medium-Suspension zur Zugabe auf die Zellen hergestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Virus-Medium-Suspension zur Infektion von Zellen

Zellkulturansatz	Medium [μl]	Virussuspension [μl]
10cm Zellkulturschale	ad 2000	500-1000
3,5cm Zellkulturschale	ad 500	100-200
Vertiefung einer 24-well-Platte	ad 150	50

Die Zellen wurden für 1h mit dieser Virus-Medium-Suspension bei 37°C inkubiert, dabei alle 20min zur besseren Verteilung des Virus geschwenkt. Nach Ende dieser ersten Inkubationszeit wurde das Kulturvolumen mit Medium(+) aufgefüllt und die Zellen erneut für 48h im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die so vermehrten Viren für die weiteren Versuche durch dreimaliges gefriertauen geerntet.

Für die Infektion von MDBK-B2 mit BVDV wurde die Mediumkombination ZB5 mit und ohne FCS, für CSFV und SK6-Zellen die Kombination aus FCS-freiem und FCS-haltigem DMEM verwendet. Alle Medien, die für Infektionszwecke verwendet wurden, enthielten Antibiotika.

2.1.3. Virustitration zur Bestimmung der kulturinfektiösen Dosis

Die Kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml (KID_{50}/ml) einer Virussuspension wurde mit Hilfe von Virustitrationen bestimmt. Diese Titrationen wurden mit Verdünnungsstufen von 1:10 im Doppelansatz in 96-well-Platten durchgeführt. Die Verdünnungsstufen wurden in Reaktionsgefäßen hergestellt, indem zu 900μl

Medium(+) 100µl Virussuspension bzw. fortlaufend 100µl der vorangegangenen Virusverdünnung zugegeben wurde. Aus der so erstellten Verdünnungsreihe wurden vier oder acht Vertiefungen der 96-well-Platte mit 100µl beschickt. Die gewählten Verdünnungsstufen entsprachen dem erwarteten Virustiter. Für die Zellkontrolle wurde eine Spalte der Platte mit 100µl Medium versehen. Für die Titration wurde die Zellzahl (MDBK-B2 bzw. SK-6) mittels Erythrosin und einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Es wurden $1,4 \times 10^4$ Zellen in 100µl pro Vertiefung verwendet. Nach 4-5 Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte die Auswertung der Titration mittels Immunfluoreszenz (III.2.1.4). Zur Berechnung der KID_{50} wurde die Formel von Spearman und Kaerber verwendet:

Berechnungsformel: $-(x_0 - d/2 + d \sum r/n)$

x_0 = reziproker Wert des \log_{10} der Verdünnungsstufe, bei der alle Vertiefungen Virus positiv sind

d = \log_{10} des Verdünnungsfaktors

n = Anzahl der Vertiefungen pro Verdünnung

r = Anzahl der Virus positiven Vertiefungen pro Verdünnungsstufe

$\sum r/n$ = Beginn der Summation bei der Verdünnungsstufe x_0 .

2.1.4. Konventionelle indirekte Immunfluoreszenz

Die konventionelle Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis einer Infektion im Zellkultursystem für die Auswertung von Titrations, Wachstumskurven, Serumneutralisationstests und der Virusanzucht aus Tierversuchsproben verwendet. Ebenfalls Anwendung fand die indirekte Immunfluoreszenz zur ersten Auswertung der Ergebnisse nach transienter Expression von Proteinen sowie für die Erfolgskontrolle nach Elektroporation.

Die Fixierung der Zellen unterschied sich je nach verwendetem mAk bzw. der Lokalisation des nachzuweisenden Proteins in der Zelle.

Wurden mAks verwendet, die das Strukturprotein E2 nachweisen (Nachweis CSFV: A18; Titration der CP7-Virusvarianten: α -BVDV Mix), so wurde der infizierte Zellrasen, nach zweimaligem Waschen mit PBS-A, mit einer eiskalten Aceton-Methanol-Lösung (1:1) bedeckt. Die Proben wurden für 15min bei -20°C fixiert und nach Abnahme der Lösung getrocknet. Die getrockneten, fixierten Zellen wurden vor Zugabe der Antikörperverdünnung mit PBS rehydriert. Mit

dem ersten Antikörper (Verdünnung siehe III.1.10) wurden die Zellen entweder 2h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Fixierung der Zellen für den Virusnachweis über das Nichtstrukturprotein NS3 (panpesti mAk Code4) erfolgte mittels Paraformaldehyd (PFA). Die infizierten Zellen wurden ebenfalls zweimal mit PBS-A gewaschen und im Anschluss mit einer 4% PFA-Lösung bedeckt und bei 4°C für 30min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Saponin (0,1% Lösung) permeabilisiert. Je nach Analyse wurden die Zellen optional vor Zugabe des mAks für 45min bei 37°C mit 2% BSA-Lösung geblockt. Die Inkubation mit Code4 fand entweder 2h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C statt.

Für beide Fixierungsarten wurden die Zellen nach Inkubation mit dem ersten mAk zweimal mit PBS gewaschen, mit der Verdünnung des Fluorophormarkierten Sekundärantikörpers (α mouse-FITC, III.1.10) versehen und 1h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen wiederum gewaschen und mit PBS bedeckt am Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE Ti analysiert.

2.1.5. Wachstumskinetik

Wachstumskinetiken wurden erstellt, um das Wachstumsverhalten der vermehrten oder generierten Virusvarianten über eine Zeitspanne von 72h zu untersuchen. 5×10^6 Zellen, 1×10^6 pro Zeitwert, wurden hierfür mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,1 des zu untersuchenden Virus infiziert. Die benötigte Virusmenge wurde in Medium(-) vorbereitet und die mit Medium(-) gewaschenen Zellen mit dieser Suspension versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1h im Brutschrank bei 37°C und regelmäßigem Aufschütteln der Zellen, wurden diese bei 1.000rpm für 8min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10ml Medium(+) resuspendiert. Jeweils 2ml der Zellsuspension wurden in insgesamt fünf 3,5cm Zellkulturschalen verteilt. Die Ernte der Zeitwerte (8, 24, 32, 48 und 72h) erfolgte durch Einfrieren auf -70°C. Die Bestimmung der Virusmengen der einzelnen Zeitwerte erfolgte durch die oben beschriebene Titration (III.2.1.3).

2.1.6. RNA Extraktion

Zur Analyse der viralen RNA aus infizierten Zellen wurde diese mit TRIzol[®] Reagent extrahiert. Das Protokoll entsprach dem Protokoll des Herstellers mit wenigen Modifikationen.

Für die Extraktion der viralen RNA wurden Zellen in 3,5cm Zellkulturschalen 2-3 Tage vorher infiziert. Der infizierte, einmal mit PBS gewaschene Zellrasen wurde mit 1ml TRIzol[®] Reagent homogenisiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 30°C für 5-10min inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc und 200µl Chloroform wurde die Probe kräftig gemischt und im Anschluss an eine weiteren Ruhezeit (3-5min bei 30°C) in der Eppendorf-Zentrifuge (10.000rpm, 4°C, 20-30min) in drei Phasen aufgetrennt. Zur Präzipitation der RNA wurde im nächsten Schritt die klare, die RNA enthaltende obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol versetzt. Nach kräftigem Mischen und einer weiteren Ruhezeit (10min bei 30°C) wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (10.000rpm, 15min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und zum Waschen des RNA-Pellets mit 75% EtOH ersetzt und bei 8.400rpm 5-10min zentrifugiert. Im weiteren Schritt wurde die RNA getrocknet und in 50µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen. Die RNA Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt und die RNA bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert.

2.1.7. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Zur weiteren Analyse der aus den Zellen extrahierten RNA wurde diese als Template zur Amplifikation von viraler cDNA in der Reverse Transkriptase PCR verwendet (RT-PCR). Im ersten Schritt wird die in der gereinigten RNA enthaltene virale RNA durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche dann in den weiteren Schritten als Matritze für die PCR genutzt und mittels der eingesetzten Primer amplifiziert wurde. Das Produkt dieser Reaktion diente im nächsten Schritt als Template für die Sequenzierung (III.2.1.10).

Für die RT-PCR wurde das Superscript III RT-PCR Kit von Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet. Reaktionsansatz sowie der Ablauf des PCR-Programmes sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die RT-PCR

Volumen [μ l]	Komponente
ad 50	RNase freies Wasser
25	Reaction Mix
1	Primer sense (10 μ M)
1	Primer antisense (10 μ M)
Variabel (< 1 μ g)	Template RNA
2	Taq-Mix

Tabelle 3: RT-PCR Programm

Schritt	Prozess	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sec.]
reverse Transkription	reverse Transkription	50	1800
initiale Denaturierung	Denaturierung	94	120
	Denaturierung	94	15
Synthesezyklen (x40)	Primerhybridisierung	50	30
	Elongation	68	60/kb
finale Synthese	Elongation	68	300

Die entstandene cDNA wurde in der analytischen Agarosegelelektrophorese (III.2.1.8) überprüft und im zweiten Schritt über die präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (III.2.1.9).

2.1.8. Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, um so die Größe und Konzentration der Fragmente zu bestimmen. Sie wird auch genutzt um die Vollständigkeit einer Restriktionsenzymsspaltung zu überprüfen. Für die Auftrennung wird ein elektrisches Feld angelegt, in welchem die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle in Richtung der Anode durch die Agarosegelmatrix wandern. Je kleiner die Fragmente, desto schneller können sie sich im Gel bewegen. Die Auftrennung ist ebenfalls von der Konzentration der Agarose und somit der Porengröße des Gels abhängig. Standardmäßig wurden 1% Agarosegele in TAE-Puffer verwendet.

Für die analytische Auftrennung wurde jeweils 1 μ l (ca. 100ng) der zu untersuchenden DNA mit 9 μ l H₂O und 2 μ l FR-Probenpuffer (entspricht 1/5 Volumen) versetzt. Die Fragmente wurden bei 60-120V aufgetrennt. Die Größe

der Fragmente wurde durch den Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe im parallel aufgetragenen Marker (1kb Plus DNA Ladder) bestimmt.

Das Gel wurde in einer GelRed™ Lösung geschwenkt, um die DNA-Banden für die weitere Analyse anzufärben. Im Anschluss wurde das Gel in der Geldokumentation bei 312nm betrachtet und das Ergebnis dokumentiert.

2.1.9. Präparative Agarosegelelektrophorese - Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Im Anschluss an die analytische Agarosegelelektrophorese folgte zur Aufreinigung des gewünschten DNA-Fragments die präparative Agarosegelelektrophorese.

Die aufzureinigende Probe wurde mit 1/5 Volumen FR-Probenpuffer versetzt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der DNA-Banden im GelRed™-Bad, wurden diese mit dem Skalpell auf dem UV-Transilluminator (302nm) ausgeschnitten.

Mit dem Nucleo-Spin® Gel and PCR Clean-up Kit wurde die DNA aus dem entstandenen Gelstück nach Anweisung des Herstellers eluiert.

2.1.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der generierten DNA-Proben wurde mittels PCR-gestützter Sequenzierung basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger überprüft. Diese Methode generiert während der PCR-Zyklen unterschiedlich lange Fragmente, deren jeweils letzte Base an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Der PCR-Ansatz enthält nur ein Oligonukleotid (im Gegensatz zur konventionellen PCR, die zwei Oligos benötigt) sowie dNTPs und ddNTPs (die Didesoxy-Varianten der dNTPs). Wird anstelle eines dNTPs ein ddNTP in den Strang eingebaut, so kommt es zum Kettenabbruch, da diese keine 3'OH-Gruppe besitzen. Die vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) sind jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die jeweils letzte Base der synthetisierten unterschiedlich langen Stränge bestimmt werden kann.

Für den Sequenzierungsansatz wurden die Komponenten des „BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Sequenzierungsansatz

Volumen	Komponenten
x µl	DNA (max. 200 ng Plasmid-DNA/ 1 – 50 ng PCR-Produkt)
1 µl	2,5 pmol Primer
1,5 µl	Sequenz Puffer
1 µl	Sequenz Mix
ad 10µl	autoklaviertes Bi-dest

Tabelle 5: Programmablauf der Sequenzierungs-PCR

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	60
	Denaturierung	95	10
Synthesezyklen (x25)	Primerhybridisierung	50	5
	Elongation	60	110

Um das PCR-Produkt von freien Nukleotiden zu reinigen und für die Analyse im 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystem (ABI) vorzubereiten, wurde es mittels EtOH- Fällung gereinigt und konzentriert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mit 1µl 3 M NaAc (pH 5) sowie 25µl 100 %igen EtOH versetzt und 20min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zwei weitere Male mit 150 µl 75 % EtOH gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die DNA nach dem trocknen in 20µl HiDi™ Formamide aufgenommen.

Die Auftrennung der markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz geschah elektrophoretisch der Länge nach im 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (ABI). Die Detektion der jeweils letzten, fluoreszenzmarkierten Base erfolgte mit Hilfe eines Lasers, der die Fluoreszenz dieses ddNTP anregt. So wurde für jede Base ein Fluoreszenzsignal mit spezifischer Wellenlänge emittiert und detektiert. Die so ermittelte Basensequenz wurde im Chromatogramm dargestellt. Weitere Analysen der erhaltenen Sequenzdaten erfolgten mit Computerprogrammen (CodonCodeAligner und Geneious).

2.2. Tierexperimentelle Methoden

2.2.1. Infektion

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierstudien (IV.1.1,IV.1.2) wurden den Versuchstieren die zu untersuchenden Viren intramuskulär (i.m.) verabreicht. Die Virussuspensionen wurden im Labor vorbereitet und in Spritzen aufgezogen. Überstieg die zu applizierende Suspensionsmenge 1,5ml, so wurde die Dosis auf zwei Spritzen verteilt. Verdünnungen wurden mit DMEM hergestellt.

Um einem Titerverlust entgegen zu wirken wurden die Proben auf Eis in den Stall transportiert. Die Virusverdünnungen wurden den Schweinen eine Handbreit hinter dem Ohrgrund in den *Musculus brachiocephalicus* injiziert. Um dem Tier sicher die berechnete Virusmenge zu verabreichen, wurde die i.m. Infektionsroute gewählt, die im Kontrast steht zur natürlichen oronasalen Infektionsroute. Diese Applikationsroute birgt jedoch das Risiko, dass größere Mengen des applizierten Volumens der Virussuspension durch Herauslaufen aus der Nase verlorengehen gehen können. So bleibt die exakt applizierte Virusmenge unklar und macht die Studie weniger vergleichbar.

2.2.2. Rücktitration der in den Studien verwendeten Viren

Zur Kontrolle wurden die Titer der eingesetzten Virussuspensionen nach den einzelnen Arbeitsschritten überprüft. Hierfür wurden pro Arbeitsschritt (I-III) 1ml der Virussuspensionen einbehalten und bei -70°C gelagert. Die Arbeitsschritte, nach denen Virus einbehalten wurde, wurden wie folgt definiert:

- I) Originalvirus (unverdünnt)
- II) applizierte Virusverdünnung vor dem Stalltransport
- III) applizierte Virusverdünnung nach Stalltransport "auf Eis"

Die kulturinfektiöse Dosis der einbehaltenen Suspensionen wurden im Anschluss per Titration bestimmt (2.1.3).

2.2.3. Bestimmung der klinischen Punktzahl

Die Bestimmung der klinischen Punktzahl der Einzeltiere ermöglicht es, die Ausprägung der klinischen Symptome vergleichend darzustellen. Zur Beurteilung der CSFV-typischen Symptome und Vergabe der für bestimmte Symptome

festgelegten Punktzahlen wurde das Schema von MITTELHOLZER et al. (2000) mit Modifikationen bezüglich des Kotabsatzes verwendet (TEWS et al., 2009). Das Schema ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Vergabe der klinischen Punktzahlen nach Mittelholzer

Parameter	Kriterium	Punktzahl
Lebhaftigkeit	aufmerksam (neugierig, steht sofort auf)	0
	leicht reduziert (steht zögernd auf, aber ohne Hilfe)	1
	müde, steht nur unter Zwang auf, legt sich wieder hin	2
	schlafend, steht auch unter Zwang nicht auf	3
Körperspannung	entspannt, gerader Rücken	0
	Steifheit und gekrümmter Rücken während des Aufstehens, anschliessend normal	1
	gekrümmter Rücken, steifer Gang bleibt erhalten	2
	Krämpfe	3
Körperform	gefüllter Magen, „runder“ Körper	0
	leerer Magen	1
	leerer Magen, dünne Körpermuskulatur	2
	abgemagert, Wirbelsäule und Rippen sichtbar, Kopf erscheint im Vergleich zum Körper zu gross	3
Atmung (Beurteilung vor Annäherung an Tiere)	Frequenz 10-15/min, Bewegung des Brustkorbs kaum sichtbar	0
	Frequenz >20/min	1
	Frequenz >20/min, deutliche Bewegung des Brustkorbs	2
	Frequenz >30/min, Atmung durch den offenen Mund	3
Gang	gut koordinierte Bewegungen	0
	Zögernder Gang, Überkreuzung der Beine wird nur langsam korrigiert	1
	deutliche Ataxie / Hinterhandlahmheit, fähig zu gehen	2
	massive Lahmheit, Unfähigkeit zu gehen	3
Haut (besonders Ohren, Nase, Beine, Schwanz)	gleichmässig leicht rosa, Haar glatt anliegend	0
	gerötete Hautpartien	1
	lila-farblose und kalte Hautareale, einige Petechien	2
	Schwarz-rote Verfärbung der Haut, keine Sensitivität, Grosse Blutungen in der Haut	3
Augen / Konjunktiven	leicht rosa-rot	0
	gerötet, klares Sekret	1
	stark gerötet, trübes Sekret	2
	stark gerötet, eitriges Sekret, hervorgehobene Blutgefässe	3
Appetit	gierig, hungrig	0
	Frisst langsam bei Fütterung	1
	Frisst nicht bei Fütterung, aber probiert Futter	2
	Frisst gar nicht, zeigt kein Interesse am Futter	3
Kotabsatz	weicher Kot, normale Menge	0
	verminderte Kotmenge, trocken/ dünner Kot, normale Menge	1
	nur geringe Menge von trockenem, fibrin-überzogenem Kot /Durchfall	2
	kein Kot, Schleim im Rectum / wässriger / blutiger Durchfall	3
Reste im Trog	Trog leer, sauber	0
	Trog fast leer, fast keine Reste	1
	Futter nur teilweise gefressen	2
	Trog immer noch voll, nichts gefressen	3

2.2.4. Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere wurde täglich während der Fütterung am Morgen rektal gemessen. Es muss bei der Bewertung der Daten beachtet werden, dass die Messung der Temperatur beim Schwein während der Fütterung zu einer

kurzfristigen Erhöhung der Körpertemperatur führen kann und somit nicht ganz ideal ist.

2.2.5. Blutentnahme

Die Blutproben am lebenden Tiere wurden aus der Vena jugularis externa bzw. der Vena cava cranialis entnommen. Hierfür wurden die Tiere entweder auf dem Rücken liegend oder stehend mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Zur Gewinnung der Blutproben wurden EDTA-Monovetten® (Sarstedt) verwendet. Serumproben wurden mit Monovetten® mit Gerinnungsaktivator (Sarstedt) gezogen.

Die Blutproben des jeweiligen Schlachttages wurden aus der Stichstelle in die entsprechende Monovette aufgefangen.

Wenn genügend EDTA-Blut gewonnen werden konnte wurde für die verschiedenen Analysemethoden jeweils 1ml aliquotiert. Ein Aliquot wurde bis zur Analyse im Blutanalysegerät bei 4°C gelagert, das Aliquot für den Virusnachweis per real-time RT-PCR wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C aufbewahrt.

Der Rest der gewonnenen EDTA-Blutprobe wurde zur Phasentrennung 15min bei 1.800rpm zentrifugiert. Die Plasmaphase wurde abgenommen und zur Lagerung bei -70°C in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die unteren Phasen wurden für die Präparation des Leukozytenkonzentrats verwendet oder verworfen.

Wurden Serumproben gewonnen, wurden diese ca. 30min bei RT inkubiert um die Blutgerinnung zu ermöglichen und im Anschluss 20min bei 5000rpm zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei -70°C gelagert.

2.2.6. Schlachtung

Die Tiere der Studien wurden von Schlachtmeistern des FLI mit der elektrischen Betäubungszange betäubt und durch Entbluten getötet.

Einzig OM#50/5 wurde vom diensthabenden Tierarzt der Insel Riems nach vorheriger Narkose mit Pentobarbital euthanasiert und bis zur Sektion am Studienende bei -20°C gelagert.

2.3. Methoden zur Analyse der Proben aus Tierexperimenten

2.3.1. Bestimmung der Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahlen wurden vollautomatisch am Hämatologie-Automat Sysmex xt 2000i aus EDTA-Blutproben bestimmt.

2.3.2. Gewinnung von Leukozytenpräparationen

Leukozytenpräparationen wurden aus Vollblut gewonnen, um in weiteren Untersuchungen aus den Leukozyten Virus zu reisolieren.

Nach Zentrifugation der EDTA-Blutproben wurde die oberste Phase, das Plasma, abgenommen und bei -70°C gelagert (III.2.2.5). Die beiden restlichen Phasen, die Interphase mit den Leukozyten und die Erythrozyten-haltige untere Phase wurden mit 10ml kaltem Lysispuffer versetzt und 10min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Proben bei 4°C zentrifugiert (1.800rpm, 5min), der Überstand verworfen und der Lysisschritt zweimal wiederholt. Das Leukozytenpellet wurde durch Schütteln des Röhrchens in frischem Lysispuffer resuspendiert. Nach den Lysisschritten folgten in gleicher Weise zwei Waschschriffe mit kaltem PBS-A. Zur Zellzahlbestimmung wurde das Pellet in PBS-A resuspendiert und die mit Türks Lösung angefärbten Leukozyten in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Die Konzentration der Leukozytenpräparationen wurde mit PBS-A auf 10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.3.3. Virusnachweis durch Anzucht in Zellkultur

Die hergestellten Leukozytenpräparationen wurden im Doppelansatz zur Virusanzucht in Zellkultur verwendet.

Dazu wurden am Vortag SK-6 Zellen in 24-well-Platten eingesät, wie in 2.1.1 beschrieben. Für den Doppelansatz wurden zwei Vertiefungen pro Probe vorbereitet.

Nach einem Mediumwechsel (DMEM(+)) wurden die Zellen mit 100µl Leukozytenkonzentrat pro Vertiefung angeimpft und für 3-4 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden vor der Ernte auf Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen überprüft, im Anschluss bei -70°C weggefroren und durch zweimaliges Frieren/Tauen lysiert.

Im zweiten Schritt wurden erneut 24-well-Platten mit SK-6 Zellen bestückt und 100µl Material aus der entsprechenden Vertiefung der ersten Platte auf die frischen Zellen übertragen. Diese erste Passage wurde abhängig von der Zelldichte erneut für 3-4 Tage im Brutschrank bei 37°C gehalten. Virus infizierte Zellen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz (2.1.4) detektiert. Für den Nachweis von CSFV wurde die Aceton/Methanol Fixierung und der mAk A18 verwendet.

Zur weiteren Analyse der reisolierten Viren wurden SK-6 Zellen in 3,5cm Zellkulturschalen eingesät und am Folgetag mit Virus-positivem Material der ersten 24-well-Platte infiziert. Nach 3 Tagen wurde aus diesen Zellen RNA extrahiert (2.1.6), per RT-PCR in DNA transkribiert (2.1.7) und die Sequenz des Fragments auf Reversionen und Mutationen überprüft (2.1.10).

2.3.4. Virusnachweis durch real-time RT-PCR

Für den Nachweis von Virusgenom im Blut der Tiere wurde neben der Virusisolierung aus Leukozytenpräparationen die real-time RT-PCR gewählt.

Für diesen Nachweis wurde die virale RNA aus den Blutproben mit Hilfe des MagAttract Virus Mini M48 Kits und der King Fischer 96 Flex Arbeitsstation aufgereinigt. Die automatisierte Aufreinigung der RNA basiert auf deren Bindung an die im Kit verwendeten Silicapartikel mit Metallkern. Vor der automatisierten Aufreinigung wird ein manueller Lyseschritt durchgeführt. Zu den in 96-deep-well-Platten vorgelegten Proben in 100µl PBS wurden 25µl Protease und 200µl AL-Lysepuffer gegeben. Die Platte wurde für 10min zur Inkubation in den Wärmeschrank bei 70°C gestellt, kurz geschüttelt und nochmals 10min wie oben beschrieben inkubiert. Den lysierten Proben wurden die Beads (MagAttract Suspension B) sowie die IC2-RNA zur internen Kontrolle zugefügt (HOFFMANN et al., 2006). Im Anschluss begann die automatische Aufreinigung in der King Fischer 96 Flex Arbeitsstation. Die Nukleinsäuren binden an die Silicapartikel, welche in der Arbeitsstation über Magnete gebunden und so in die verschiedenen Lösungen verbracht werden können. Es fanden Waschschrte mit Lösungen des Kits (Buffer AW1 und Buffer AW2) sowie in 100%igem EtOH statt. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden im letzten Schritt im AVE Puffer des Kits gelöst und die RNA konnte für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurde im Hinblick auf die weitere Analyse negatives Ausgangsmaterial (Serum oder Plasma) als RNA-Isolierungskontrollen (RIC) mit aufgereinigt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion in Echtzeit (real-time RT-PCR) kann für den Nachweis von Virusgenom in Blut-, Gewebe- oder Organproben zum Einsatz kommen. Bei dieser Methode werden kleine Fragmente viraler RNA in cDNA transkribiert, die durch die anschließende PCR zu nachweisbaren Mengen amplifiziert und mittels Fluoreszenzfarbstoff markierten Sonden detektiert werden.

Für die Detektion der viralen RNA aus den bereits aufgereinigten Proben kam das Quantitect® Probe RT-PCR Kit (Quiagen) und das CFX96 real-time Detektionssystem (Bio-Rad) zum Einsatz. Die duplex PCR, die auf FAM-Fluoreszenz markierten spezifischen CSFV Primern sowie HEX-Fluoreszenz markierten Primern zum Nachweis der internen Kontrolle basiert (siehe Tabelle 7), wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt (HOFFMANN et al., 2005).

Tabelle 7: Zusammensetzung der Primer-Sonden-Mixturen

Bezeichnung (Konzentration)	Volume n [µl]	Komponenten	Sequenz
EGFP-Mix 1 (Limit 5) (2,5 pmol Primer/µl + 2,1 pmol Sonde/µl)	5	EGFP1-F (100 pmol/µl)	5'-GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC-3'
	5	EGFP2-R (100 pmol/µl)	5'-GAA CTC CAG CAG GAC CAT G-3'
	2,5	EGFP-Probe 1 (100 pmol/µl)	5'-HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A- BHQ1-3'
	187,5	0,1 x TE (pH 8,0)	
CSF-Mix 1 (10 pmol Primer/µl + 1,25 pmol Sonde/µl)	20	CSF100-F (100 pmol/µl)	5'-ATG CCC AYA GTA GGA CTA GCA- 3'
	20	CSF192-R (100 pmol/µl)	5'-CTA CTG ACG ACT GTC CTG TAC-3'
	2,5	CSF-Probe 1 (100 pmol/µl)	5'-FAM-TGG CGA GCT CCC TGG GTG GTC TAA GT- BHQ-2-3'
	157,5	0,1 x TE (pH 8,0)	

Nach Vorlage des Mastermixes in die 96-well-Platten wurden die extrahierten Proben (mit IC2 aufgearbeitet), RNA-Isolierungskontrollen (RIC; mit IC2 aufgearbeitet), die positive Kontroll RNA (T7-PK3alf) und eine Negativkontrolle („no template control“, NTC) hinzugefügt und vorsichtig gemischt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR

Volumen [μ l]	Komponente
3,25	RNase freies Wasser
12,5 μ l	2x Quantitect-Probe RT-PCR Master Mix
0,25 μ l	Reverse Transkriptase Mix (RT-Mix)
2 μ l	Primer-Sonden-Mix 1: EGFP-Mix 1 (Limit 5)
2 μ l	Primer-Sonden-Mix 2: CSF-Mix 1
20 μl	Total Volumen Mastermix
5 μ l	Template RNA (Probe/RIC/NTC/T7-PK3alf)
25 μl	Total Volumen Reaktionsansatz

Das Programm im CFX96 wurde wie folgt programmiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Programmablauf der duplex real-time RT-PCR

Schritt	Prozess	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
Reverse Transkription	Reverse Transkription	50	1800
Inaktivierung RT Aktivierung Taq	Inaktivierung RT Aktivierung Taq	95	900
Syntheszyklen (x42)	Denaturierung	95	15
	Primerhybridisierung	57	30
	Elongation	68	30

Anhand der Fluoreszenzwerte für beide Kanäle (HEX und FAM), die während der Annealingphase gemessen wurden, konnten die Daten ausgewertet werden. Hierbei wurde im HEX-Kanal die interne Kontrolle IC2 nachgewiesen und gab Hinweise auf die korrekte Aufarbeitung der RNA. Weder für die Positivkontrolle noch für die NTC durfte ein HEX-Wert nachweisbar sein, der den Schwellenwert überschreitet. Der FAM-Kanal maß die amplifizierten CSFV-Fragmente. Für diesen Kanal galt bei korrektem Ablauf, dass weder für die RIC noch die NTC sollte ein FAM-Wert feststellbar sein durfte.

Zur Auswertung der Daten wurde das zum Cycler gehörige Computerprogramm von Bio-Rad verwendet.

2.3.5. Serumneutralisationstest - Nachweis neutralisierender Antikörper

Die Seren der Versuchstiere wurden mit Hilfe des Serumneutralisationstests auf CSFV-spezifische neutralisierende Antikörper untersucht. Der Test beruht auf der

Fähigkeit der potentiell in den Seren vorhandenen neutralisierenden Antikörper das Testvirus an der Infektion der Zellen zu hindern.

Die in den Tierversuchen gewonnenen Seren wurden vor dem Test für 30min bei 56°C inaktiviert. Getestet wurden die Seren in 96-well-Platten als Triplets und in kontinuierlichen 1:2 Verdünnungsschritten. Hierfür wurden pro Vertiefung 50µl DMEM(+) vorgelegt und in der ersten Reihe mit 100µl der ersten Verdünnungsstufe der Seren begonnen (i.d.R. wurde mit einer 1:4 Verdünnung in der ersten Reihe begonnen). 50µl pro Vertiefung der ersten Reihe wurden mit einer Multikanalpipette in die nächste Reihe überführt, mit dem vorgelegten Medium sanft vermischt und wiederum 50µl dieser Verdünnungsstufe in die nächste Reihe überführt. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurden die übrigen 50µl pro Vertiefung verworfen. Zu jeder Verdünnung wurden 50µl mit 100KID₅₀ des Testvirus gegeben. Zur Kontrolle der zugegeben Virusmenge und Validierung des Tests wurde auf einer Platte in fünf Spalten eine Rücktitration des Virus durchgeführt (vergleiche 2.1.3). Die erste Spalte wurde mit 100µl der verwendeten Virusverdünnung beschickt, in den weiteren vier Spalten wurden die Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ erstellt und untersucht. Diese Platte enthielt ebenfalls eine Reihe, die als negative Zellkontrolle nur mit 100µl Medium(+) beschickt wurde. Zusätzlich wurden ein negatives Serum sowie ein positives Serum aus vorangegangenen Versuchen als weitere Kontrolle auf dieser Platte untersucht. Diese Positiv- und Negativkontrolle wurde in derselben Art und Weise wie die zu untersuchenden Seren verdünnt und mit Virus versetzt. Die Serum-Virus-Mischung wurde im Anschluss bei 37°C für 1h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit können potentiell im Serum vorhandene neutralisierende Antikörper das zugegebene Testvirus neutralisieren. Nach der Inkubationszeit sah das Protokoll eine Zugabe von 1,4x10⁴ SK-6 Zellen pro Vertiefung vor. In der ersten Studie musste die Zellzahl aufgrund des gesteigerten Zellwachstums auf 1,0 x10⁴ SK-6 Zellen pro Vertiefung angepasst werden. Die Platten wurden für 4 Tage bei 37°C inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz (Fixierung Aceton/Methanol; mAk: A18) ausgewertet (2.1.4). Für die Auswertung des SNTs galt, die Vertiefungen in denen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, wurden als negativ gewertet, da in diesen keine Neutralisation des Testvirus stattgefunden hat. Proben ohne Fluoreszenzsignal galten als positiv im Test. In

diesen Seren waren neutralisierende Antikörper gegen das Testvirus vorhanden. Die Serumtiter wurden mit der Formel nach Spearman und Kaerber bestimmt (siehe auch 2.1.3). Diese bestimmte den reziproken Wert der Serumverdünnungsstufe, bei der 50% der Zellen in den Vertiefungen bei einer Inkubation mit 100 KID₅₀ vor Infektion geschützt waren. Über die Rücktitration wurde die eingesetzte Virusmenge ebenfalls mit der Spearman-Kaerber-Formel bestimmt. Der Test galt nur als valide, wenn die Abweichung des ermittelten Virustiters weniger als -0,5 log₁₀ abwich. Somit sollte der ermittelte Titer des Testvirus in der Rücktitration zwischen 63,2 – 200 KID₅₀ /100µl liegen.

2.3.6. ELISA

Für den Antikörpernachweis im Verlauf der Studien wurde der kommerziell erhältliche IDEXX CSFV Ab ELISA verwendet. Dieser „blocking“ ELISA basiert auf dem Nachweis E2 spezifischer Antikörper in Serum oder Plasma. Die Tests wurden jeweils in Doppelbestimmung und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis der Platten wurden im ELISA Reader ausgelesen.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Nukleinsäure basierte Methoden

2.4.1.1. PCR

Zur gezielten Mutagenese oder Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) angewendet. Je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments wurde die Pfu-DNA-Polymerase (Promega) oder die Phusion-Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Die für die PCR benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion hergestellt. Diese sind unter 1.4 aufgelistet.

2.4.1.1.1. Standard PCR

Die Standard PCR wurde zur Amplifikation von DNA Fragmenten verwendet. Für diese wurde der Reaktionsansatz wie in Tabelle 10 angegeben hergestellt und das PCR-Gerät mit dem Programm in Tabelle 11 programmiert.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Standard PCR mit der Phusion-Polymerase

Volumen [μ l]	Komponente
ad 50	bidest. H ₂ O
10	5X Phusion HF- Puffer
1	dNTPs (10 mM)
2,5	Primer sense (10 μ M)
2,5	Primer antisense (10 μ M)
Variabel (< 250 ng)	Template DNA
2,5	Phusion DNA Polymerase

Tabelle 11: Programm für die Standard PCR unter Verwendung der Phusion-Polymerase

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
initiale Denaturierung	Denaturierung	98	30
Syntheszyklen (30x)	Denaturierung	98	5-10
	Primerhybridisierung	45-72	10-30
	Elongation	72	15-30/kb
Endsynthese	Elongation	72	300-600

2.4.1.1.2. Fusions-PCR

Die Fusions-PCR wurde verwendet, um zwei zuvor generierte PCR-Fragmente (III.2.4.1.1.1) miteinander zu verbinden, so dass ein größeres PCR-Produkt aus den Teilstücken entsteht, beispielsweise zur Deletion größerer Abschnitte. In einer ersten PCR wurden spezielle Primer verwendet, die die zu fusionierenden Einzel-PCR-Fragmente mit komplementären Enden versehen. Nach Überprüfung des PCR-Erfolges im analytischen Agarosegel (III.2.1.8) und Reinigung durch präparative Gelelektrophorese (III.2.1.9) erfolgt die Fusions-PCR in zwei Schritten. Die isolierten Fragmente dienten als Matrizen und konnten im ersten Teil der PCR über ihre komplementären Enden hybridisieren. So entstand ein DNA Fragment, das im zweiten Teil der PCR nach Zugabe von sense und antisense Primern amplifiziert wurde (Tabelle 13).

Tabelle 12: Reaktionsansatz der Fusions-PCR

Volumen [μ l]	Komponente
ad 50	bidest. H ₂ O
10	5X Phusion HF Buffer
1	dNTPs (10 mM)
0,5-1	Template DNA – Fragment 1
0,5-1	Template DNA – Fragment 2
2,5	Phusion DNA Polymerase
2,5	Primer sense (10 μ M)
2,5	Primer antisense (10 μ M)

Tabelle 13: Fusions PCR - Schematische Übersicht über den Ablauf der PCR

Schritt	Vorgang	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
initiale Denaturierung	Denaturierung	98	30
Synthesesyklen (10x)	Denaturierung	98	10
	Hybridisierung	40-58	15
	Elongation	72	15-30/kb
Pause	Zugabe Primer	4	
Synthesesyklen (20x)	Denaturierung	98	10-30
	Primerhybridisierung	45-58	15
	Elongation	72	15-30/kb

2.4.1.1.3. Quik Change-PCR

Um eine gezielte Mutation direkt in ein Plasmid einzuführen, wurde die Quik Change[®]-PCR (QC-PCR) verwendet. Dies hat den Vorteil, dass das Produkt direkt im Anschluss an die QC-PCR für die Transformation kompetenter Bakterien genutzt werden kann.

Für die QC-PCR wurden komplementäre Mutageneseprimerpaare eingesetzt, die die gewünschte Basensubstitution, einmal in in Plus-Strang und einmal in Minus-Strang Orientierung, enthielten. Für diese PCR wurde die Pfu-Polymerase in folgendem Ansatz verwendet:

Tabelle 14: QC-Reaktionsansatz

Volumen [μ l]	Komponente
40,5	bidest. H ₂ O
1	dNTPs (10mM)
2	Template-DNA (100ng/ μ l)
1	Primer sense (10 μ M)
1	Primer antisense (10 μ M)
5	10x Pfu-PCR-Puffer
0,5	Pfu-Polymerase

Der Programmablauf wurde, wie in Tabelle 15 angegeben, programmiert:

Tabelle 15: Programmablauf QC-PCR

Schritt	Vorgang	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	30
Syntheseyklen (17x)	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	48-54	60
	Primerextension	68	120/kb
Endsynthese	Primerextension	68	120

Im Anschluss an die PCR wurde nach Kontrolle der PCR im analytischen Agarosegel (III.2.1.8) zu jedem Ansatz 1,0 μ l des Restriktionsenzym DpnI zugegeben. Diese Restriktionsenzymbehandlung wurde eingesetzt, um das eingesetzte methylierte parentale Plasmid zu spalten. Das Enzym DpnI spaltet spezifisch methylierte DNA an der Sequenz GATC. Somit bleibt nach der Behandlung nur die neu synthetisierte, unmethylierte DNA übrig.

2.4.1.2. Restriktionsenzymspaltung

Restriktionsenzymspaltungen wurden zu verschiedenen Zwecken eingesetzt. Durch die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen vorhersagbare dsDNA-Fragmente mit spezifischen 5'- und 3'-Enden. Diese Eigenschaft wurde für mehrere Methoden ausgenutzt.

Zur Generierung neuer Plasmide (III.2.4.1.5) wurden DNA-Fragmente, die miteinander verbunden werden sollten, mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen vorbereitet. Dazu wurde die Plasmid-DNA oder das PCR-Fragment bei der für das Enzym idealen Temperatur im geeigneten Puffer inkubiert. Während der Ansatz weiter inkubierte, wurde nach 1h eine Probe

entnommen und in der analytischen Gelelektrophorese (III.2.1.8) auf Vollständigkeit der Spaltung überprüft. War die DNA vollständig restringiert, wurde das gewünschte Fragment mittels präparativer Gelelektrophorese (III.2.1.9) isoliert. Lag das Ausgangsprodukt noch nicht vollständig gespalten vor, wurde die Inkubationszeit entsprechend verlängert. Im Partialverdau, der angewendet wurde, wenn die Erkennungssequenz des benötigten Enzyms mehrfach im zu verwendenden Fragment vorkam, wurde das DNA-Fragment nur für 1min mit dem entsprechenden Enzym inkubiert und das gewünschte Fragment entsprechender Größe aus dem Agarosegel präpariert (III.2.1.9).

Eine weitere Anwendung fanden Restriktionsendonukleasen zur Überprüfung der DNA-Minipräparationen oder DNA-Midipräparationen. Durch eine spezifisch ausgewählte Spaltung (30min bei Enzym-spezifischen Bedingungen) konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung anhand des auftretenden Bandenmusters überprüft werden, ob das gewünschte Plasmid enthalten war. Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben mit den für die Enzyme empfohlenen Puffern verwendet.

2.4.1.3. Dephosphorilierung der DNA

Mit Restriktionsenzymen vorbereitete Vektoren (III.2.4.1.2) wurden mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt, um die Religation komplementärer Enden zu verhindern. Die linearisierte Vektor-DNA wurde hierfür mit 1U alkalischer Phosphatase für 30min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurde der gesamte Ansatz auf 65°C erhitzt und für 5min inkubiert, um die alkalische Phosphatase zu deaktivieren. Im Anschluss wurde der Ansatz mit dem Nucleo-Spin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt.

2.4.1.4. Auffüllen von 3'-Überhängen oder Entfernen von 5'-Überhängen zu glatten Enden restriktionsenzymgespaltener DNA

Um vor der Religation (III.2.4.1.5) der gespaltenen Plasmid-DNA (III.2.4.1.2) inkompatible 3'-Überhänge aufzufüllen oder 5'-Überhänge abzuspalten, wurde die DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment verwendet. Dieses Enzym verfügt über 3'→ 5'-Exonukleaseaktivität und in Anwesenheit hoher dNTP-Konzentrationen über 5'→ 3'-Polymeraseaktivität. Zur Generierung der „blunt

ends“ wurde das geschnittene DNA-Fragment mit 1U DNA Polymerase I pro μg DNA und entsprechendem Puffer versetzt und für 15min bei 25°C inkubiert. Je nach gewünschtem Effekt wurden 33 μM je dNTP zum Reaktionsansatz gegeben. Im Anschluss wurde die DNA für die Ligation mit dem Nucleo-Spin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt.

2.4.1.5. Ligation der DNA

Für die Ligation der vorbereiteten DNA-Fragmente wurde die Aktivität der T4-Ligase genutzt, die enzymatisch komplementäre Enden kovalent zu einer zirkulären DNA verbindet. Das Verhältnis Vektor zu Insert (1:2-5) wurde so gewählt, dass immer ein Überschuss an Insert in der Reaktion vorhanden war. Die Reaktion wurde, wie beispielhaft in Tabelle 16 dargelegt, gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt und für 1-2h bei RT inkubiert.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Ligation

Volumen [μl]	Komponente
5,5	bidest. H ₂ O
2,5	gereinigte und verdaute Insert- DNA
0,5	gereinigte und verdaute Vektor-DNA
1	10x Ligasepuffer mit ATP
0,5	T4-DNA Ligase

2.4.1.6. In vitro Transkription

Für die in vitro Transkription wurde das RiboMAX™ Large Scale RNA Production System – T7 Kit verwendet.

Bevor die Plasmid-DNA in diesem System eingesetzt werden konnte, wurde sie mit dem Restriktionsenzym SmaI linearisiert, das die zu transkribierenden Sequenz im zirkulären Plasmid am 3'-Ende der viralen cDNA schneidet. In den Restriktionsenzymsspaltung wurden 10 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die linearisierte DNA wurde im Anschluss durch Phenol-Chloroform-Extraktion (III.2.4.1.7) gereinigt, in 20 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Hälfte in die in vitro Transkription eingesetzt. Der Reaktionsansatz, der bei 37°C für 4h inkubiert wurde, ist in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17: Reaktionsansatz der In vitro Transkription

Volumen [μ l]	Komponenten
10	Plasmid-DNA (linearisiert & gelgereinigt)
5	5x T7 Puffer
7,5	NTP-Mix (rATP, rCTP, rGTP, rUTP; 25mM)
2,5	T7-Enzym Mix

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dem Ansatz 1 μ l DNase zugefügt, um die eingesetzte Plasmid-DNA zu zerstören und dieser für weitere 15min bei 37°C belassen. Diesem Schritt folgte eine weitere Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung der synthetisierten RNA, die in DEPC-behandeltem Wasser gelöst wurde. Vor der Elektroporation von Zellen wurde die Konzentration der synthetisierten RNA am Nanodrop gemessen.

2.4.1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Reaktionsansatz der zu reinigenden Probe mit H₂O auf 100 μ l aufgefüllt und mit 100 μ l puffergesättigtem Phenol versetzt. Der Ansatz wurde kräftig gemischt und zur Phasentrennung für 5min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 μ l Chloroform reextrahiert. Zu diesem Zweck wurde die Probe wieder kräftig gemischt und erneut bei 14.000rpm für 1min zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Um die Nukleinsäuren aus dem wässrigen Überstand zu fällen, wurde dieser in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 12 μ l 2M KAc (pH 5,6) und 250 μ l EtOH gemischt. Für eine gesteigerte Ausbeute wurde der Ansatz über Nacht bei -70°C gelagert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden für 5min bei 14.000rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l H₂O aufgenommen.

2.4.1.8. Elektroporation

Um die synthetisierte RNA in die Zellen zu bringen, wurde die Elektroporation gewählt. Für diese Experimente wurden Zellen am Tag zuvor in 10cm Zellkulturschalen eingesät, so dass am Tag des Experiments ein konfluenten Zellrasen vorlag. Mit Trypsin wurden die Zellen von der Schale gelöst, in FCS

haltigem Medium resuspendiert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1.000rpm für 8min pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen in PBS-A resuspendiert und ein weiteres Mal für 8min bei 1.000rpm zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden nach Abnahme der Waschlösung in 1,6ml PBS-A aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden 0,5ml der Zellsuspension mit 0,5-2 μ l der vorbereiteten RNA gemischt und in die Elektroporationsküvette überführt. Diese wurde in den Elektroporator eingesetzt und die Zellen mit zwei Pulsen von je 180V und 490 μ F für jeweils ca. 1s elektroporiert. Der Ansatz wurde nach einer Ruhezeit von ca. 3min aus der Küvette gespült, in FCS-haltigem Medium aufgenommen und in jeweils eine Vertiefung zweier 6-well-Platten verteilt. Eine Platte wurde zur Kontrolle des Elektroporationserfolges am Folgetag fixiert und per indirekter Immunfluoreszenz überprüft (III.2.1.4). Bei positivem Ergebnis wurden die Zellen der zweiten 6-well-Platte in eine 10cm Zellkulturschale überführt. Zusätzlich wurden die Zellen auf die Entwicklung eines zytopathogenen Effektes (cpe) überprüft. Für Reinfektionsexperimente, die die Bildung infektiöser Partikel nachweisen, wurde die Passage 0 durch dreimaliges Frieren/Tauen lysiert und neue Zellen mit einem Teil der Suspension angeimpft. Der Infektionserfolg wurde wiederum durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft und das generierte Virus mittels Wachstumskinetik (III.2.1.5) und Sequenzanalyse (III.2.1.10) charakterisiert.

2.4.2. Mikrobiologische Methoden

2.4.2.1. Herstellung von Agarplatten

Agarplatten wurden hergestellt indem 500ml LB-Medium mit 7,5g Agar versetzt und autoklaviert wurden. Vor Zugabe des Antibiotikum (0,1mg/ml Ampicillin) wurde die Lösung auf ca. 40°C abgekühlt. Mit dieser Mischung wurden Plastikpetrischalen befüllt und nach dem Abkühlen bei 4°C gelagert.

2.4.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur mit E-coli Bakterien (siehe III.1.11.2) in LB-Medium angeimpft. 100ml LB-Medium wurden

wiederum ausgehend von dieser Kultur angeimpft, bei 37°C geschüttelt und das Wachstum der Bakterien regelmäßig bei OD₆₀₀ im Photometer überprüft bis diese einen Wert von 0,6-0,7 erreichten. Die Kultur wurde in der Zentrifuge bei 4.000rpm für 10min sedimentiert. Das Pellet wurde in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 40min auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde diese Suspension noch einmal bei 4.000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert und das Sediment in 5ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Von dieser Lösung wurden Aliquots erstellt und weitere 3h auf Eis gekühlt, um sie dann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C zu lagern.

2.4.2.3. Hitzeschocktransformation

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen (Top10 oder HB 101) mit der Hitzeschockmethode transformiert. Der gesamte Ligationsansatz oder 1-5µl einer QC-PCR (je nach PCR-Effizienz) wurden zu 50µl kompetenten Zellen gegeben, die zuvor für ca. 20min schonend auf Eis aufgetaut worden waren. Nach Zugabe der DNA wurde die Mischung noch einmal für 20min auf Eis gelagert und im Anschluss für 2min bei 42°C dem Hitzeschock im Wasserbad unterzogen. Der Abkühlung auf Eis für 2min folgte die Zugabe von 200µl LB++ zum Reaktionsansatz. Dieser wurde dann bei 37°C für 1h inkubiert. Der Ansatz wurde nach Ablauf der Inkubationszeit auf einer vorgewärmten Agarplatte ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C gelagert.

2.4.2.4. DNA-Präparation

2.4.2.4.1. DNA-Minipräparationen

Für die Isolierung kleinerer Mengen DNA zur Überprüfung des generierten Plasmids wurde je Übernachtskultur 5ml LB Medium +Amp mit einer Kolonie von einer Agarplatte (III.2.4.2.3) angeimpft und bei 37°C geschüttelt. 1,5ml dieser Kultur wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 10min bei 5.000rpm oder 30s bei 11.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 100µl Solution I versetzt und unter Schütteln gelöst. Zu dieser Suspension wurde 200µl Solution II gegeben und die Lösung nach kurzem Schütteln für 5min auf Eis gestellt. 150µl Solution III wurde im nächsten Schritt zugegeben, der Ansatz 3x invertiert und nach weiteren 10min auf Eis für 10min

bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 400µl Isopropanol aus und bei 14.000rpm für 10min pelletiert. Die DNA wurde vor dem Trocknen mit 200µl Isopropanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (14.000rpm, 10min). Das Sediment wurde in 50µl H₂O resuspendiert und im Weiteren mittels Restriktionsanalyse (III.2.4.1.2) und Sequenzierung (III.2.1.10) überprüft.

Vorbereitend für die Sequenzierung wurde die DNA-Minipräparation mit RNase behandelt. Der gesamte Ansatz wurde mit 3µl RNase A (10µg/µl) und 10µl Restriktionsenzym-puffer versetzt, auf 100µl mit H₂O aufgefüllt und für 15min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde über das Nucleo-Spin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt im Sequenzansatz als Template verwendet.

2.4.2.4.2. DNA-Midipräparationen

DNA-Isolierung im größeren Maßstab wurde mit dem Nucleobond© Xtra Midi Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Aus den überprüften Bakteriensuspensionen für die Minipräparationen wurden 100µl entnommen und, je nach Art des zu vermehrenden Plasmids, in 100ml oder für den „low copy“ Ansatz in 200ml LB Medium+Amp überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Der gesamte Ansatz wurde mit dem Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet und die isolierte DNA in 50µl H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde im Nanodrop bei 260nm bestimmt. Zusätzlich wurde die optische Dichte bei 280nm gemessen, um ein Maß für die Reinheit der Präparation zu erhalten. Im Weiteren wurden die Plasmide mittels Restriktionsenzym-spaltung (III.2.4.1.2) und Sequenzierung (III.2.1.10) überprüft.

2.4.3. Proteinanalytische Methoden

2.4.3.1. Transiente Proteinexpression mittels Vacciniavirus MVA T7

Proteine wurden von transfizierten Expressionskonstrukten transient in mit Vacciniavirus MVA T7 infizierten BHK-21 Zellen exprimiert. Für die Experimente wurden 3,5cm Petrischalen oder 24-well-Platten verwendet, die am Vortag mit BHK-21 Zellen versehen worden waren, so dass sie am Morgen zu 80% konfluent

waren. Vorbereitend wurden die Zellen mit Medium gewaschen, mit MVA T7 in FCS freiem Medium infiziert und für 1h bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Während der Inkubationszeit wurde die DNA für die Transfektion vorbereitet. Die Plasmid-DNA wurde in Optimem vorgelegt (24well: 1µg DNA in 50µl; 3,5cm Zellkulturschale: 5µg DNA in 125µl Optimem), Lipofectamin 2000 (1µl/1µg eingesetzter DNA) in 50µl oder 125µl Optimem. Beide Ansätze wurden nach 5min Inkubation bei RT zusammengeführt und gut gemischt. Der Ansatz wurde für ca. 20min bei RT gelagert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Transfektionsansatz zugegeben. Die Schalen wurden mit Optimem aufgefüllt, so dass der Zellrasen ausreichend mit Medium bedeckt war. Nach 8h bei 37°C wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz fixiert (III.2.1.4,III.2.4.3.2) oder für die Analyse im Western Blot (III.2.4.3.3) geerntet.

2.4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz Zeiss Axiovert Apotome

Für die Aufnahme hochauflösender, konfokaler Immunfluoreszenzbilder ohne störendes Streulicht aus anderen Bildebenen wurde das Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome® Modul verwendet.

Zur Herstellung von Proben, die an diesem Gerät analysiert werden sollten, wurden BHK-21 Zellen auf Deckgläschen in 24-well-Platten eingesät. Die Proteine wurden, wie unter III.2.4.3.1 beschrieben, transient exprimiert. Die Zellen wurden pro Vertiefung mit 250µl 4% PFA für 30min bei 4°C fixiert und anschließend mit 250µl 0,1%iger Saponin-Lösung permeabilisiert (5min, 4°C). Zwischen den Schritten wurden die Zellen je zwei Mal vorsichtig mit PBS-A gewaschen. Vor Inkubation mit den Antikörpern wurde ein Blockschritt mit 250µl BSA-Lösung (2%) bei 37°C durchgeführt, um den Hintergrund durch unspezifische Bindung der Antikörper herabzusetzen. Der erste Antikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war, wurde in der unter III.1.10 angegebenen Verdünnung eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Doppelfärbung wurde zuerst ein Gemisch aus beiden Antikörpern (Code4 & WB112) für die Inkubation über Nacht bei 4°C verwendet. Im Verlauf der Versuche wurde das Protokoll angepasst. Die Inkubation mit Code4 erfolgte weiterhin über Nacht bei 4°C, aber die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (WB112) wurde erst im Anschluss bei 37°C für 1h durchgeführt.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS-A wurden die Proben für 1h bei 37°C mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Einzelfärbung mit Alexa Fluor®488, die Doppelfärbung aus einem Gemisch aus Alexa Fluor®488 - IgG2a und Cy3-IgG1 erfolgte in den angegebenen Verdünnungen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-A und H₂O, zur Verhinderung von Salzkristallbildung, wurden die Deckgläschen mittels Mowiol-Eindeckelmedium auf gläsernen Objektträgern fixiert und für ca. 2h bei 37°C getrocknet. Die Proben wurden am Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome® Modul analysiert. Die Aufnahmen wurden mit der zugehörigen Software Axiovision bearbeitet, so dass jeweils die Parameter der Positivkontrolle für die Analyse der weiteren Aufnahmen übernommen wurden, um so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

2.4.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Detektion des zu untersuchenden exprimierten Proteins (III.2.4.3.1) im Western Blot wurden die Proteine der Probe zuerst mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schägger und Jagow unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamidgele gegossen, die aus einem die Probe konzentrierenden Sammelgel und dem Trenngel bestanden. Die Konzentration des Trenngels wurde entsprechend der erwarteten Größe des nachzuweisenden Proteins gewählt. In Tabelle 18 ist der Ansatz für jeweils 2 oder 4 Mini-Gele verschieden konzentrierter Trenngele sowie dem Sammelgel angegeben. Die Gele wurden kurz vor Verwendung gegossen. Vorbereitend wurden die Glasplatten (Mini-Protean System, Bio-Rad) mit Aceton gereinigt, in die Gießapparatur eingespannt und die Polymerisation des Gels durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Nach dem Gießen des Trenngels (ca. $\frac{3}{4}$ der Endhöhe) wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel gegossen und ein 15er Probenkamm hineingesteckt.

Tabelle 18: Pipettierschema für SDS-Gele (2 oder 4) unterschiedlicher Konzentrationen.

	Trenngel								Sammelgel	
	8%		10%		12%		15%		2	4
	2	4	2	4	2	4	2	4		
H ₂ O [ml]	5,84	11,68	5,12	10,24	4,4	8,8	3,32	6,64	1,8	3,6
Gelpuffer [ml]	4,8	9,6	4,8	9,6	4,8	9,6	4,8	9,6	0,7	1,4
Glycerin [ml]	0,8	1,6	0,8	1,6	0,8	1,6	0,8	1,6	-	-
Acrylamid [ml]	2,88	5,76	3,6	7,2	4,32	8,64	5,4	10,8	0,28	0,56
APS [μl]	70	140	70	140	70	140	70	140	23,2	46,4
TEMED [μl]	6,8	13,6	6,8	13,6	6,8	13,6	6,8	13,6	2,4	4,8

Vor dem Einspannen des Gels in die Elektrophoreseapparatur wurden die Probestaschen vorbereitend jeweils einmal mit Bidest und Jagow-Kathodenpuffer gewaschen.

Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen in SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol (reduzierende Bedingungen) aufgenommen und bei 95°C für 10min erhitzt.

Nach Zugabe des Jagow-Kathoden- und Jagow-Anodenpuffers in die jeweilige Kammer der Elektrophoreseeinheit wurden jeweils 15μl der Probe aufs Gel aufgetragen und bei 100-130V für 1-2h aufgetrennt.

2.4.3.4. Transfer der Proteine auf Membran (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel (III.2.4.3.3) wurden die Proteine auf eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen. Zu diesem Zweck wurde das Polyacrylamidgel für ca. 20min in kaltem Transferpuffer equilibriert und im Anschluss mit der Membran in die Mini-Trans Blot Kammer (Biorad) eingebracht. PVDF-Membranen wurden vor der Verwendung in Methanol aktiviert. Die Proteine wurden durch Anlegen einer Spannung von ca. 100V an der Kammer für 1h auf die Membran übertragen.

2.4.3.5. Immundetektion der Proteine

Die im SDS-PAGE aufgetrennten und auf die Membran übertragenen Proteine wurden auf dieser mit spezifischen Antikörpern detektiert. Vorbereitend wurde die Membran für 0,5-1h in Blockpuffer (5% Magermilchlösung) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach kurzem

Waschen der Membran in PBS-T wurde diese in die vorbereiteten Antikörperlösung (Verdünnungen siehe III.1.10) gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 10min wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 2h bei RT im Dunklen geschwenkt. Die verwendeten sekundären Antikörper waren direkt an eine Meerettich-Peroxidase gekoppelt. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol durch H_2O_2 aus dem zugegebenen Substrat (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA), so dass eine Chemilumineszenz an Stellen mit gebundenem mAk auftritt. Nach vorherigem Waschen der Membran für dreimal 10min in PBS-T wurde das Substrat, je nach erwarteter Signalintensität, pur oder 1:2 mit PBS-T verdünnt auf die Membran gegeben und nochmals für 2min im Dunkeln geschwenkt. Die Lichtemission wurde mittels eines Röntgenfilms detektiert. Dieser wurde für 2s-1h exponiert und danach in eine Maschinell entwickelt.

2.4.3.6. Nachweis eines Proteins mit mehreren Antikörpern auf derselben Membran

Um die Proteine auf derselben Membran mit einem weiteren Antikörper nachzuweisen, wurde die Membran mit Stripping-Puffer behandelt, um die an den Proteinen haftenden primären und sekundären Antikörper zu entfernen.

Zu diesem Zweck wurde die Membran nach Exposition des Röntgenfilms (III.2.4.3.5) für 5-10min in Stripping-Puffer geschwenkt, der Puffer verworfen und der Behandlung mit frischem Puffer wiederholt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10min in PBS-T sowie zweimal für 5min in TBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschen konnte der Blot, entsprechend III.2.4.3.5, in Blocklösung überführt werden und mit der Immundetektion der Proteine mit dem Kontrollantikörper fortgefahen werden.

IV. ERGEBNISSE

1. Bedeutung der Dimerisierung des E^{rns} Proteins für die Virulenz von Pestiviren

Die Auswirkung von Mutationen, die zum Verlust der E^{rns}-Homodimer-Bildung führen, wurden in vorausgegangen tierexperimentellen Studien in vivo untersucht. In diesen wurde gezeigt, dass Deletion oder Mutation des für die Bindung kovalent verbundener Dimere essentiellen Cysteincodons 171 zur Attenuierung des Virus im natürlichen Wirt führt (TEWS et al., 2009).

Bei In-vivo-Versuchen, in denen die Auswirkungen verschiedener Veränderungen des Codons 171 getestet wurden, konnte in einigen reisolierten Viren eine Pseudoreversion des Serins 209 zu Cystein (S₂₀₉C) festgestellt werden. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass das Protein durch diese Mutation die Eigenschaft Homodimere zu bilden wiedererlangt hat (Gregor Meyers, unveröffentlichte Daten). Ob diese im Lauf der Infektion aufgetretene Mutation einen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen in den einzelnen Tierversuchen hatte, konnte nicht ausgeschlossen werden (SCHÜRMANN, 2010).

Die Auswirkungen der Pseudoreversion auf den Phänotyp der Viren, basierend auf der wiedererlangten Eigenschaft des Proteins Homodimere bilden zu können, wurde für zwei Virusvarianten im Tier untersucht. Die beiden zu beurteilenden Virusmutanten enthielten die Pseudoreversion S₂₀₉C in Kombination mit attenuierenden Veränderungen, einerseits der Deletion des Codons 171 (C₁₇₁Δ/S₂₀₉C) und zum Zweiten in der Kombination mit der Mutation zu Serin (C₁₇₁S/S₂₀₉C). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben ein heterogenes Bild mit weiteren Hinweisen auf einen möglichen Einfluss der Dimerisierung des Proteins auf die klinische Ausprägung. Auf Grund der Daten ließ sich aber keine finale Aussage treffen (WIRTZ, 2013).

Um die Auswirkung der wiedergewonnenen Eigenschaft des E^{rns}, über eine sehr ungewöhnlich lokalisierte Pseudoreversion stabile Homodimere zu bilden und den damit verbundenen Pathogenitätsrückgewinn besser beurteilen zu können, war es Teil der vorliegenden Arbeit, in einem Versuch die klinische Ausprägung

der parentalen dimerisierungsnegativen Mutante (EP 82/2, C₁₇₁S) mit der zugehörigen Pseudorevertante 1990CIII (C₁₇₁S/S₂₀₉C) sowie dem Wildtypvirus im Tier zu vergleichen.

1.1. Pathogenitätsstudie I - TV #61/13

In der Pathogenitätsstudie I (TV #61/13) wurden die parentale dimerisierungsnegative Virusmutante EP 82/2 (C₁₇₁S) und die Pseudorevertante 1990CIII (C₁₇₁S/ S₂₀₉C) im Vergleich zu einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtyp (1347 RTFIII) untersucht. Im Vordergrund stand die Beurteilung des Phänotyps der eingesetzten Viren.

EP 82/2 enthält die bereits beschriebene Punktmutation C₁₇₁S, welche die Ausbildung von E^{rns}-Homodimeren unterbindet und in vivo zur Attenuierung des Virus führt.

Die zweite zu untersuchende Virusvariante, 1990CIII, enthält zusätzlich zum oben beschriebenen Austausch C₁₇₁S die Pseudoreversion S₂₀₉C, welche dem Protein die Ausbildung von Homodimeren über das neu eingeführte Cystein ermöglicht.

1.1.1. Charakterisierung der zu untersuchenden Viren

Die Generierung der beiden Virusmutanten wurde in vorrausgegangenen Dissertationen beschrieben (SCHÜRMANN, 2010; WIRTZ, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Viren erneut verwendet und detaillierter charakterisiert. Es wurden neue Viruspassagen in Zellkultur generiert und für den Versuch charakterisiert (III.2.1.2,III.2.1.5). Die Wachstumseigenschaften der vierten Passage des Wildtyps und der fünften Passage der Pseudorevertante 1990CIII unterschieden sich kaum und resultierten im selben Endtiter. Die dimerisierungsnegative Variante EP 82/2, siebte Passage, blieb in ihrem Wachstum etwas hinter den zur Dimerbildung-fähigen-Varianten zurück (Abbildung 4). Die Stabilität der Mutationen wurde via RT-PCR und Sequenzierung überprüft und bestätigt (III.2.1.6,III.2.1.7,III.2.1.10).

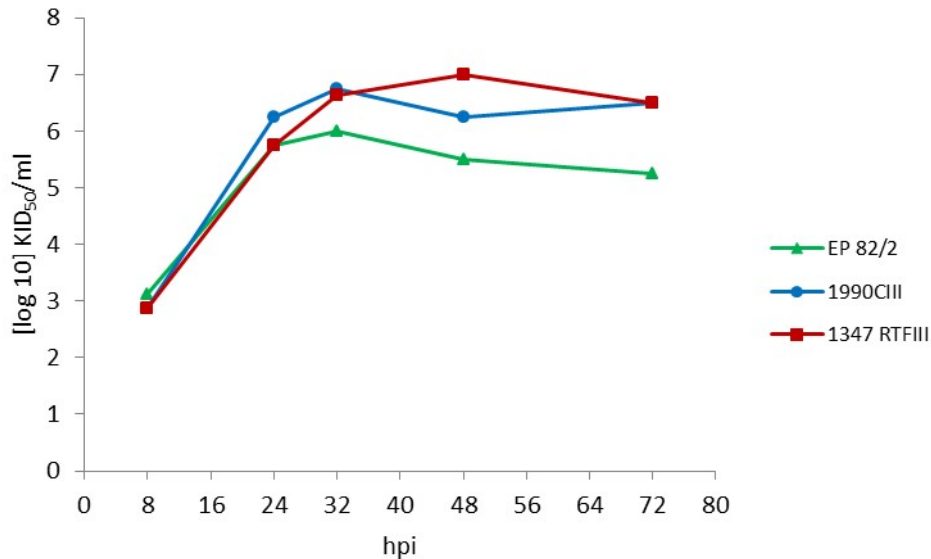


Abbildung 4: Wachstumskinetik der eingesetzten Viren EP 82/2 (7.Passage), 1990CIII (5.Passage) und 1347 RTFIII (4.Passage) in SK6 Zellen.

1.1.2. Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Für die Studie #61/13 wurden insgesamt zwölf Schweine mit einem Gewicht von ca. 20kg bei Einstellung verwendet. Die Tiere wurden sechs Tage vor Infektion (-6dpi) vom Herkunftsbetrieb (Landwirtschaftsbetrieb e.G. Schwasdorf) angeliefert, markiert und auf drei Stallungen im Isolierstallgebäude der Insel Riems verteilt. Die Gruppen bestanden jeweils aus vier Tieren. Es ist anzumerken, dass es während der Anlieferung zu Rankämpfen unter den Tieren kam und diese mit kleineren äusseren Verletzungen abgeladen wurden. Während der Akklimatisierung der Tiere an die veränderten Bedingungen konnten diese Blessuren ausheilen. Gruppe 1 wurde ausgewählt zur Infektion mit der dimerisierungsnegativen Mutante EP 82/2, Gruppe 2 mit der Pseudorevertante 1990CIII. Als Kontrollgruppe erhielten die Tiere der Gruppe 3 die Wildtypvirusvariante 1347 RTFIII (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht zu Gruppen, Stallverteilung, eingesetzten Viren sowie internen Tiernummern

Gruppe	Stall	zu charakterisierendes Virus	Kennzeichnung
1	141/6	EP 82/2 (7. Passage, dimerisierungsnegativ)	46/1; 47/2; 48/3; 49/4
2	141/1	1990C III (5. Passage, dimerisierungspositiv)	50/5; 51/6; 52/7; 53/8
3	145	1347 RTF III (4. Passage, Wildtyp, dimerisierungspositiv)	54/9; 55/10; 56/11; 57/12

1.1.3. Zeitplan und Probenentnahme

Der Gesundheitszustand der Tiere sowie die Körpertemperatur wurden täglich ab -2dpi bis zum Ende der Studie bestimmt. Zur Beurteilung des Gesundheitszustandes wurden die Beobachtungen durch Vergabe einer klinischen Punktzahl (III.2.2.3) festgehalten, mit Ausnahme der Tage 17 und 18p.i. EDTA Blutproben für Leukozytenzählung, Virusnachweis und Plasma Isolierung wurden zu bestimmten Zeitpunkten vor und nach der Infektion (Tabelle 20) aus der Vena jugularis externa bzw. der Vena cava cranialis der Tiere entnommen (III.2.2.5). Zusätzlich wurden vor der Infektion sowie am Schlachttag des jeweiligen Tieres Serumproben zur Ermittlung der Titer neutralisierender Antikörper gewonnen. Einzige Ausnahme stellte OM#50/5 dar. Von diesem Tier wurde an 10dpi keine abschließende Serumprobe entnommen. Das planmäßige Ende der Studie an Tag 21 stellte die Schlachtung der bis dahin noch lebenden Tiere dar. Drei Tiere aus der Kontrollgruppe, sowie zwei Tiere aus Gruppe 2 wurden vorzeitig getötet (Tabelle 20). Nach einer ausgeprägten Stressreaktion bei der Blutentnahme 7dpi des Tieres #53/8 wurde von diesem Tier bewusst an 9dpi keine Probe entnommen.

Tabelle 20: Zeitplan und Probennahme TV# 61/13

Tage nach Infektion	Maßnahmen/ Parameter/ Proben				
	Klinische Beurteilung	Körper-temperatur	Heparinblut (Leukozyten-zählung, BC, Plasma)	Serum	Schlachtung
-2 dpi	x	x			
-1 dpi	x	x	x	x	
0 dpi	x	x			
1 dpi	x	x			
2 dpi	x	x	x		
3 dpi	x	x			
4 dpi	x	x			
5 dpi	x	x	x		
6 dpi	x	x			
7 dpi	x	x	x	#52/7	#52/7
8 dpi	x	x			
9 dpi	x	x	X (excl. #53/8)		
10 dpi	x	x			#50/5 (Euthanasie)
11 dpi	x	x			
12 dpi	x	x	x		
13 dpi	x	x			
14 dpi	x	x			
15 dpi	x	x	x	# 55/10, 56/11, 57/12	# 55/10, 56/11, 57/12
16 dpi	x	x			
17 dpi		x			
18 dpi		x			
19 dpi	x	x			
20 dpi	x	x			
21 dpi				x	x

1.1.4. Infektion und Rücktitration der eingesetzten Viren

Die Infektion der Tiere erfolgte an Tag 0 intramuskulär (III.2.2.1). Jedes Tier erhielt eine Gesamtdosis von $10^{5,8}$ KID₅₀ in einem Gesamtvolumen von 4,1ml DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium). Aufgeteilt auf zwei Dosen wurden diese jeweils in den rechten und linken Musculus brachiocephalicus injiziert. In

den vorangegangenen Versuchen wurden für die Infektion der Tiere zwei Infektionsrouten kombiniert, zwei Drittel wurden intranasal, ein Drittel i.m. verabreicht. Um sicher zu gehen, dass jedes Tier dieselbe Menge an Virus erhält, wurde für diesen Versuch die Applikation rein i.m. gewählt, um Virusverluste durch die intranasale Verabreichung zu vermeiden. Um die verschiedenen Verdünnungen auf ihren Virustiter untersuchen zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 1ml der Virussuspensionen einbehalten (III.2.2.2). Die Ergebnisse der Rücktitrationen der Proben der verschiedenen Arbeitsschritte ergaben die erwarteten Mengen an Virus (Tabelle 21). Die geringen Abweichungen der Titer liegen im Rahmen der testüblichen Schwankungen.

Tabelle 21: Rücktitrationen der zurückgestellten Virussuspensionen TV#61/13

	Gruppe 1 (Stall 141,6) EP#82/2 (dimerisierungsnegativ)		Gruppe 2 (Stall 141,1) 1990CIII (dimerisierungspositiv)		Gruppe 3 (Stall 145) 1347 RTF III (Wildtyp) (dimerisierungspositiv)	
	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)
I) Originalvirus (direkt nach dem Auftauen auf -70°C)	10 ^{5,5}	10 ^{5,1875}	10 ^{6,25}	10 ^{6,125}	10 ^{6,875}	10 ^{6,8125}
II) 1. Verdünnung (direkt auf - 70°C)	x	x	10 ^{5,25}	10 ^{5,19}	10 ^{5,125}	10 ^{5,19}
III) 1. Verdünnung (nach Stalltransport auf -70°C)	10 ^{5,25}	10 ^{5,1875}	10 ^{5,125}	10 ^{5,19}	10 ^{5,375}	10 ^{5,19}

1.1.5. Klinische Punktzahl

Beginnend mit Tag -2pi wurde täglich der Gesundheitszustand der Tiere überprüft und über die klinische Punktzahl dokumentiert (III.2.2.3; Tabelle 20).

Alle Tiere der Kontrollgruppe, infiziert mit dem Wildtypvirus, entwickelten schweinepesttypische Symptomatik. Drei Tiere dieser Gruppe, OM#55/10, 56/11, 57/12, wurden an Tag 15pi aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet. Das verbleibende Tier dieser Gruppe, OM#54/9, fiel durch einen etwas anderen Krankheitsverlauf auf. Dieses Tier befand sich zwischen Tag 12 und 15pi in

Remission und zeigte danach in einer zweiten Welle wieder CSFV Symptomatik, die bis zum Ende des Versuches anhielt. Tiere infiziert mit der Pseudorevertante 1990CIII entwickelten alle Anzeichen einer Infektion mit CSFV. Ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden zeigte an 7dpi OM#52/7 und verstarb nach dem Bluten. Ein weiteres Tier dieser Gruppe, OM#50/5, wies an Tag 10pi eine Beinverletzung auf und wurde aus tierschutzrechtlichen Gründen euthanasiert. Für dieses Tier war an diesem Tag keine adäquate Beurteilung der klinischen Punktzahl möglich, da die CSFV induzierte Symptomatik nicht klar von der Verletzung und dem damit zusammenhängenden Unwohlbefinden zu unterscheiden war. Deshalb wurde die Punktzahl dieses Tages in der Auswertung der Studie nicht berücksichtigt. In der ersten Gruppe waren nur sehr unspezifische Anzeichen einer Infektion, in Form einer reduzierten Fresslust zwischen Tag 7 bis 14pi, bei allen Tieren zu verzeichnen (Abbildung 5).

1.1.6. Körpertemperatur

Rektale Körpertemperaturmessungen wurden täglich durchgeführt und, nach einer Gewöhnungsphase, ab Tag -2pi bis zum Ende der Studie festgehalten (III.2.2.4). In Gruppe 1 konnte eine leichte Erhöhung der Temperatur bei allen Tieren beobachtet werden. Der zweite Fieberpeak des Tieres #48/3 könnte in einer aufgestiegenen bakteriellen Infektion begründet sein (IV.1.1.8). Temperaturanstiege zu Werten oberhalb des physiologischen Bereiches waren auch für die Tiere in Gruppe 2 zu verzeichnen, hier besonders an den Tagen 7-10pi. In beiden Gruppen normalisierten sich die Temperaturen bis zum Ende der Studie. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten einen Anstieg der Körpertemperatur ab Tag 4pi. Die Fieberkurven dieser Gruppe verliefen in Wellen mit Temperaturspitzen um 41,5°C, typisch für eine Infektion mit klassischer Schweinepest. Entsprechend dem klinischen Verlauf zeigte OM#54/9 auch eine Absenkung der Fieberkurve (Abbildung 6).

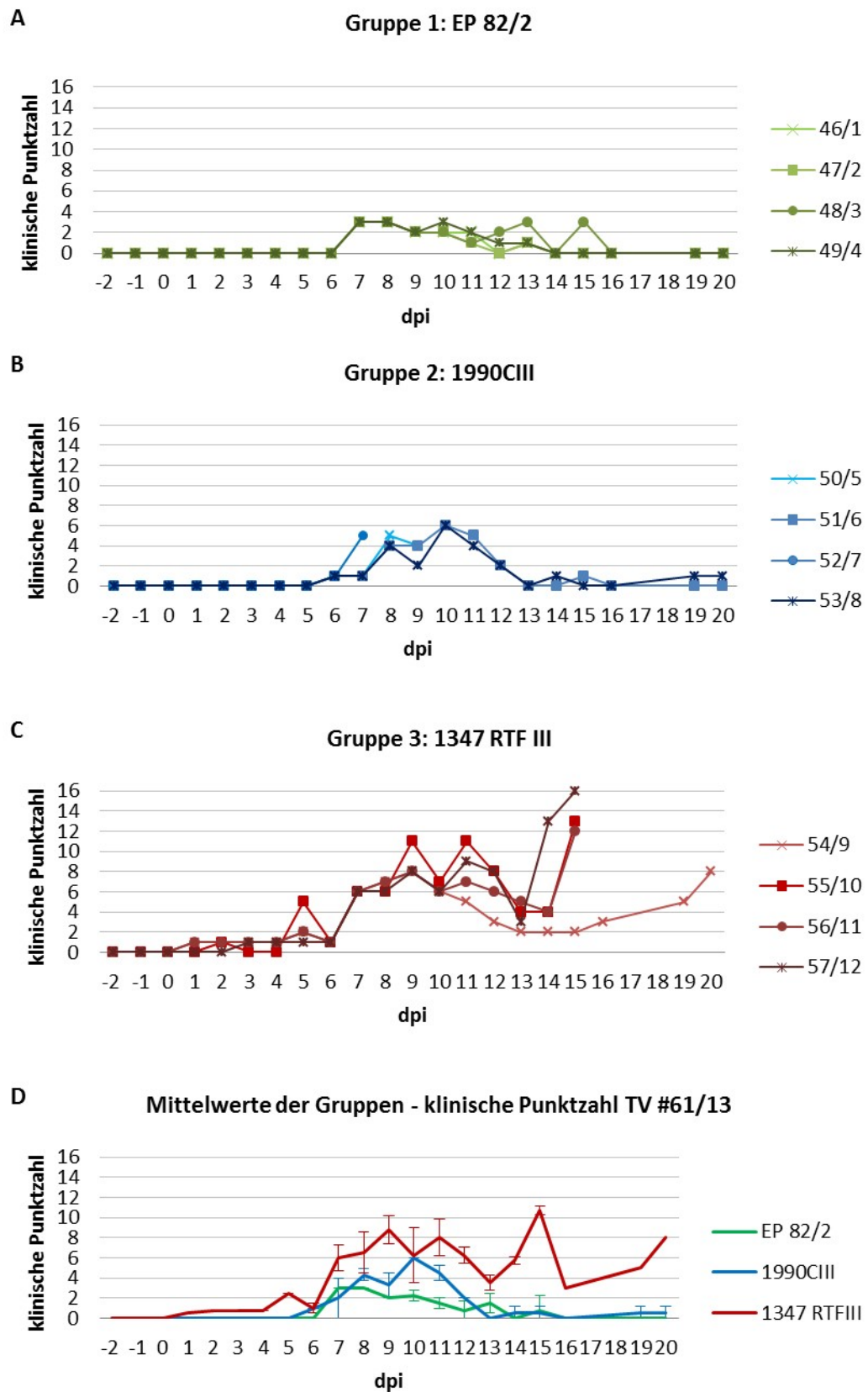


Abbildung 5: Klinische Punktzahlen der Gruppen 1-3 im Versuchsverlauf.

(A-C) Punktzahlen der einzelnen Tiere aus den verschiedenen Gruppen. (D) Mittelwerte der Gruppen mit Standardabweichung.

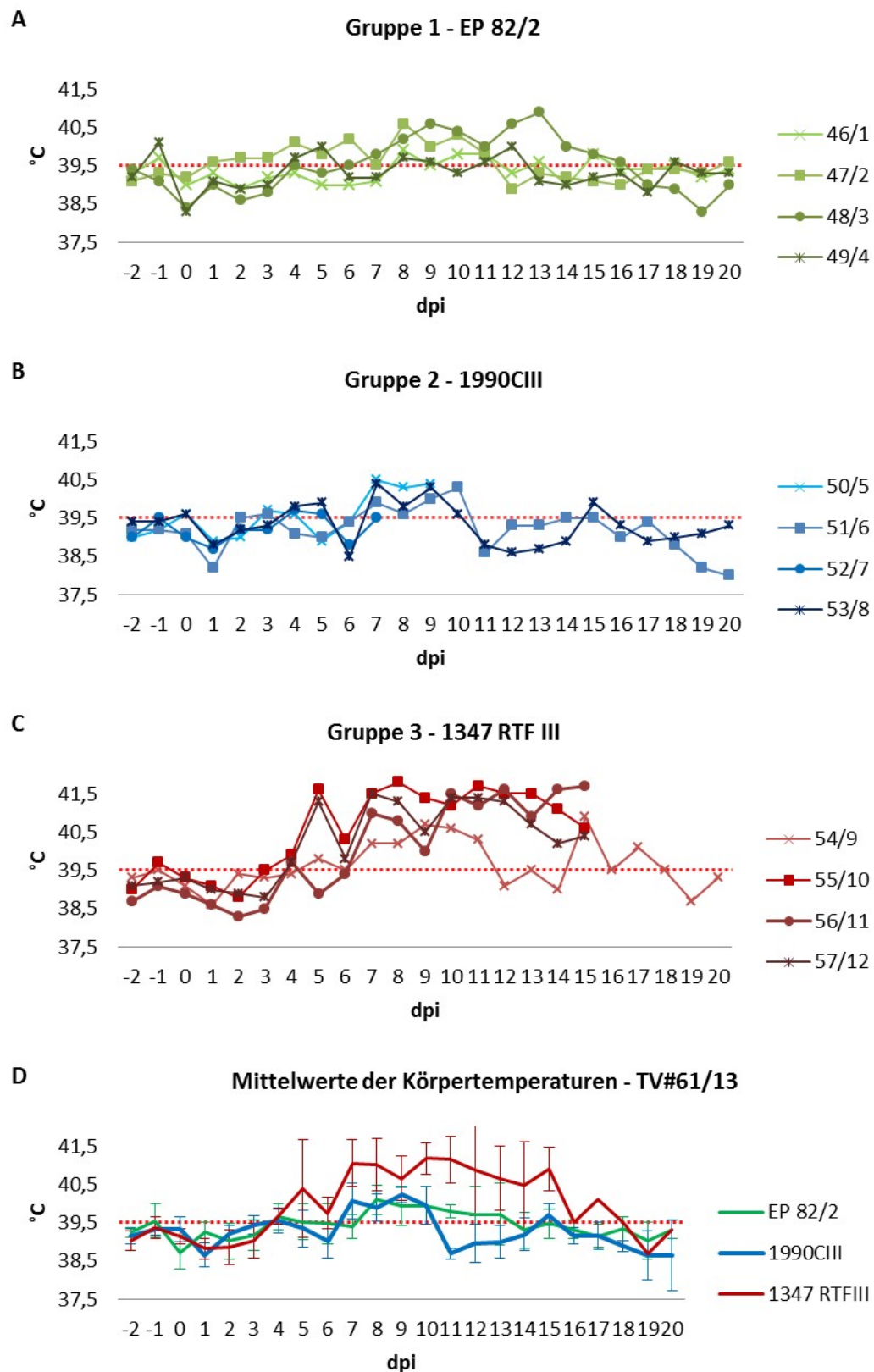
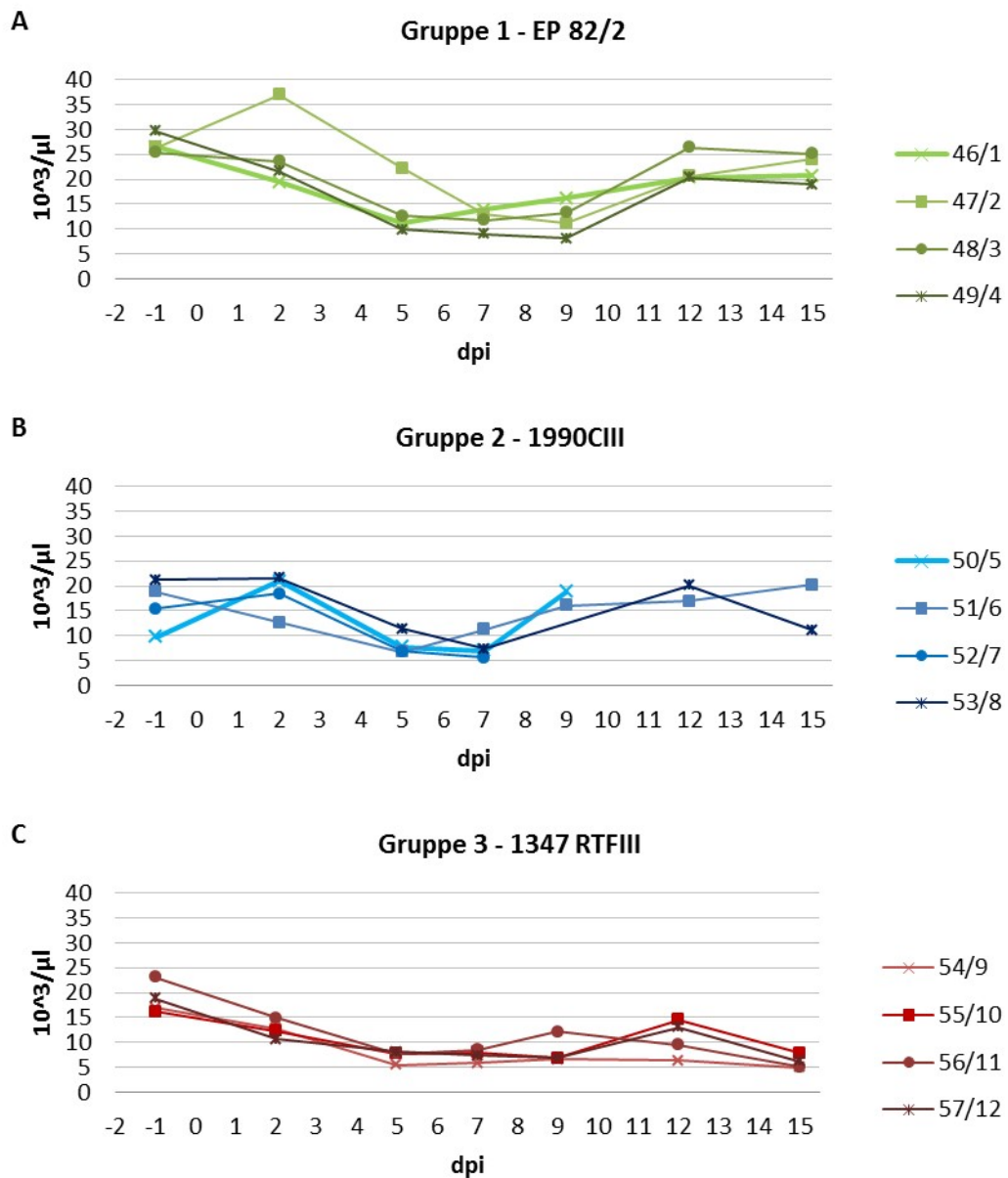


Abbildung 6 : Körpertemperaturen der Tiere im Verlauf des Versuchs.

(A-C) Körpertemperaturen der Einzeltiere. (D) Körpertemperaturen der Gruppen im Durchschnitt mit Standardabweichungen. Die gestrichelte rote Linie markiert die Grenze der physiologischen Temperatur.

1.1.7. Leukozytenzahlen

Die Gesamtleukozytenzahl im Blut der Tiere wurde mit Hilfe des Sysmex XT-2000iV Blutanalysegerätes bestimmt (IV.1.1.3,III.2.3.1). Alle Tiere dieser Studie zeigten eine für eine Infektion mit CSFV typische Leukozytopenie mit unterschiedlicher Ausprägung. Bereits an Tag 2pi ließ sich in der Wildtypvirus infizierten Gruppe ein Abfall der Leukozytenzahlen beobachten, der sich mit kleinen Abweichungen bis zur letzten untersuchten Probe durchzog. Die Leukozytenwerte der restlichen Tiere normalisierten sich bis zum Ende der Studie (Abbildung 7).



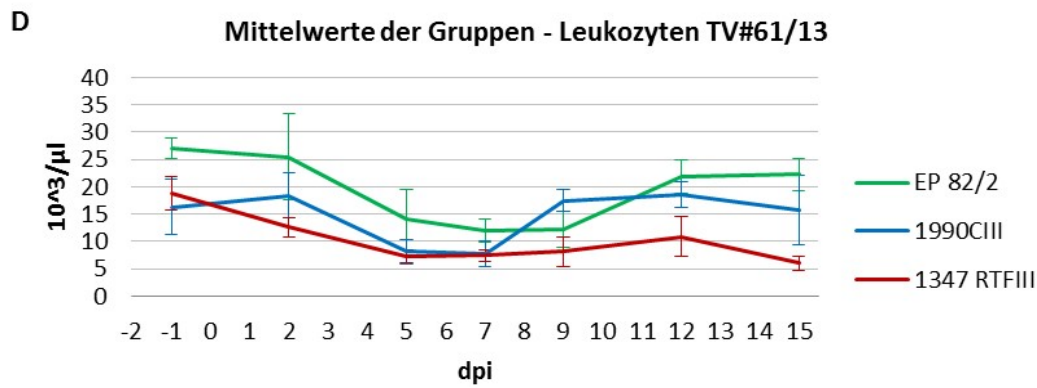


Abbildung 7: Gesamtleukozytenzahlen.

(A-C) Entwicklung der Leukozytenzahlen jedes einzelnen Tieres der verschiedenen Gruppen im Versuchsverlauf. (D) Übersicht über den Verlauf der Leukozytenzahlen in den Gruppen als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Leukozytenzahlen wurden mittels Sysmex XT-2000iV aus EDTA Blut ermittelt.

1.1.8. Pathologie

Die pathologische Untersuchung der Tiere wurde im Anschluss an die Schlachtung durchgeführt. Dies gilt nicht für OM#50/5, das Tier, welches an Tag 10pi euthanasiert wurde. Dieses wurde bis zur Termination der Studie bei -20°C gelagert und zur Untersuchung mit den restlichen Tieren an 21dpi aufgetaut. Ohne besondere Befunde bezüglich einer Infektion mit CSFV zeigten sich die Tiere der Gruppe 1. Festzuhaltende Befunde dieser Gruppe, infiziert mit EP 82/2, waren für Tier OM#48/3 eine Perikarditis in Verbindung mit vergrößerten Lungenlymphknoten. Diese Befunde lassen auf eine, durch das Bluten aufgestiegene Entzündung schließen. In Gruppe 2 wies OM#52/7, welches an Tag 7pi nach dem Bluten verstarb, in der Pathologie einige Veränderungen auf, die den zuvor beobachteten schlechten Gesundheitszustand des Tieres an diesem Tag unterstreichen. Festzuhalten waren eine ausgeprägte Aszites, geringfügig geschwollene Darmlymphknoten, sowie stark vergrößerte, blutig infiltrierte Mandibularlymphknoten. Im Gegensatz zu den vorher aufgeführten Befunden lässt sich der letzte Befund, ein Lungenemphysem, nicht auf die Infektion mit der Pseudorevertante beziehen. Die restlichen Tiere dieser Gruppe blieben bei der pathologischen Untersuchung an 21dpi ohne besondere Befunde. Das bei -20°C gelagerte Tier, OM#50/5, wurde so gut beurteilt, wie es der Zustand nach dem

Auftauen zuließ. In der mit dem Wildtypvirus infizierten Gruppe 3 konnten für drei der vier Tiere Petechien auf beiden Nieren, vergrößerte und blutig infiltrierte Mandibular-, Inguinal- sowie Darmlymphknoten befundet werden (OM#54/9, 55/10, 57/12). Zusätzlich ließ sich eine Aszites für OM#54/9 diagnostizieren. Unerwarteter Weise blieb die Untersuchung des Tieres OM#56/11 ohne besondere Befunde, mit Ausnahme einer blutig verkrusteten Iliocaecalklappe.

1.1.9. Virusnachweis durch real-time RT-PCR


Um die Infektion der Tiere zu überprüfen und eine Virämie zu bestätigen, wurden Aliquots der EDTA Blutproben bei -70°C aufbewahrt und nach Ende des Versuches mittels real-time RT-PCR analysiert (III.2.3.4). Auch geringe Mengen an Virusgenom können mit dieser PCR zu nachweisbaren Mengen amplifiziert werden. Die RNA wurde mit Hilfe magnetischer Silicapartikel aus den Blutproben isoliert und im nächsten Schritt in der real-time RT-PCR amplifiziert. Im „FLI in Haus Protokoll“ werden zum Nachweis von CSFV RNA zwei Primer-Sonden-Paare verwendet. Zum einen FAM-Fluoreszenz markierte spezifische CSFV Primer sowie HEX-Fluoreszenz markierte Primer, die zur Amplifikation der internen Kontrolle dienen. Die emittierte Fluoreszenz der Sonden ist proportional zur Menge der gebildeten DNA und kann so quantifiziert werden. Der ΔC_t -Wert gibt an, wann die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt, also den Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität signifikant über den Schwellenwert ansteigt.





In Tabelle 22 sind die ΔC_t Werte der Einzeltiere aufgelistet. In Abbildung 8 sind die Gruppendurchschnittswerte im Zeitverlauf grafisch dargestellt.

Eine Virämie konnte in allen Tieren bestätigt werden, beginnend bereits an Tag 2pi. Die Tiere der Wildtypgruppe (Gruppe 3) blieben bis zum Ende der Studie positiv und zeigten mit ΔC_t Werten bis zu 16,41 an Tag 15pi hohe Viruslasten. Für Tier #53/8 gab es für 9dpi keine Blutprobe. Die Viruslasten in Gruppe 2 waren etwas weniger ausgeprägt, mit dem niedrigsten ΔC_t von 24,92 für OM#50/5 9dpi. Beide Tiere, die bis zum Studienende lebten, waren in der Lage, das Virus aus dem Blut zu eliminieren. Dies gilt nicht für alle Tiere der dimerisierungsnegativen Gruppe (Gruppe1), in der für zwei Tiere noch an Tag 21pi Virus im Blut detektierbar war, wenn auch mit relativ hohen ΔC_t -Werten um

34 (OM#47/2 und #48/3). Die höchste gemessene Viruslast dieser Gruppe lag bei ΔCt 27,93 (OM#47/2, 7dpi) (Tabelle 22).

Tabelle 22: Virusnachweis mittels real-time RT-PCR.

ΔCt -Werte der Einzeltiere im Versuchsverlauf. - negatives Ergebnis,  keine Probe.

	Gruppe 1 - EP82/2				Gruppe 2 - 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTF III					
	46/1	47/2	48/3	49/4	50/5	51/6	52/7	53/8	54/9	55/10	56/11	57/12		
-1dpi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2dpi	-	-	-	35,97	-	-	-	-	39,10	34,85	-	34,43		
5dpi	32,37	31,14	31,31	31,73	30,03	29,61	29,62	27,72	27,27	27,37	27,58	27,11		
7dpi	31,62	27,93	28,90	29,48	26,34	31,21	28,47	27,38	24,18	22,09	28,90	21,30		
9dpi	34,96	32,13	30,33	28,91	24,92	30,86			21,49	17,08	18,45	17,74		
12dpi	36,68	33,94	31,05	34,21					20,05	18,11	18,15	16,90		
15dpi	-	40,85	32,23	35,48					19,78	18,44	17,71	16,41		
21dpi	-	34,75	34,35	-					25,12					

Im Gruppenkontext (Abbildung 8) ergibt sich eine graduelle Abstufung zwischen den drei Gruppen. Ab 7dpi sinkt die Viruslast in Gruppe 1 langsam ab, während für die beiden mit den dimerisierungspositiven Viren infizierten Gruppen noch ein Anstieg zu verzeichnen ist. In der Wildtypgruppe steigt diese deutlicher an, als für die 1990CIII infizierten Tiere. In dieser Gruppe ist ab Tag 9 ein Abfall der Kurve zu beobachten.

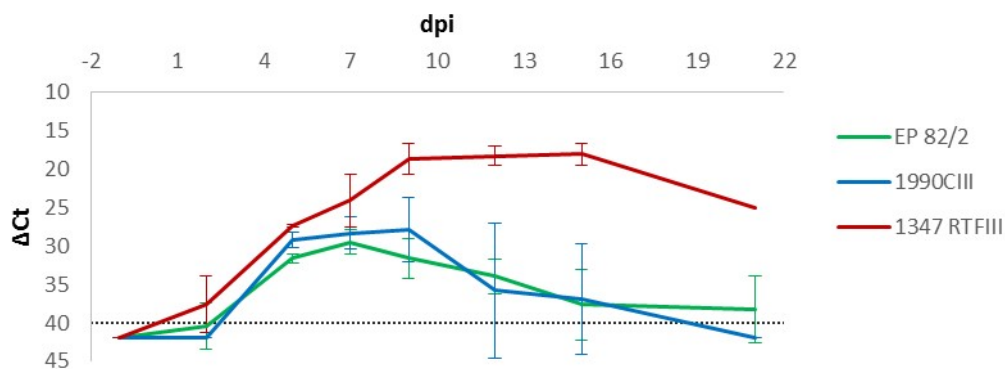


Abbildung 8: Ergebnisse der real-time RT-PCR im Gruppenkontext mit Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markierte den negativen Bereich > 40 .

1.1.10. Virusanzucht in der Zellkultur aus Leukozytenpräparationen zur Überprüfung der Stabilität der Mutationen

Leukozytenpräparationen wurden aus den gewonnenen EDTA Blutproben am Tag der Blutentnahme hergestellt und bei -70°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert (III.2.3.2). Für die Virusanzucht aus diesem Material wurden SK6 Zellen eingesät und infiziert (III.2.3.3). Viruspositive Kulturen wurden via indirekter Immunfluoreszenz (III.2.1.4) mit dem mAk A18 identifiziert. Alle Tiere, mit Ausnahme von OM#46/1 Gruppe 1, waren mindestens an einem Tag in einem der Doppelansätze positiv. In der Übersicht (Tabelle 23) sind die Ergebnisse aufgelistet. Es zeigte sich eine Abstufung der positiven Ergebnisse von Gruppe 1 mit den wenigsten positiven Wells über Gruppe 2 mit einem deutlichen Anstieg in der Gesamtanzahl positiver Virusnachweise an verschiedenen Tagen zu Gruppe 3, in deren Proben sich noch in der letzten Präparation (15dpi) Virus nachweisen ließ.

Tabelle 23: Ergebnisse der Virusanzucht in SK6 Zellen aus Leukozytenpräparationen im Doppelansatz.

Grau unterlegte Virusanzuchten wurden zur weiteren Untersuchung per RT-PCR und Sequenzierung ausgewählt.

	Gruppe 1 - EP82/2				Gruppe 2- 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTFIII			
	46/1	47/2	48/3	49/4	50/5	51/6	52/7	53/8	54/9	55/10	56/11	57/12
-1dpi	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2dpi	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
5dpi	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7dpi	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+		+/+	+/+
9dpi	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
12dpi	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-		-/-	+/+	+/+	+/+	+/+
15dpi	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-		-/-	+/+	+/+	+/+	+/+

Zur Überprüfung der Virussequenz im Bereich der Mutationen wurde mit Material aus positiven Virusanzuchten (Tabelle 23, grau unterlegt) wiederum SK6 Zellen infiziert, RNA isoliert (III.2.1.6), via RT PCR amplifiziert und sequenziert (III.2.1.7, Primer: IB80/IB95rev; III.2.1.10, Sequenzprimer: M348+). Es konnte gezeigt werden, dass die eingeführten Mutationen in beiden Virusvarianten

erhalten blieben. In den reisolierten EP 82/2 Varianten ist die Substitution des Cysteins durch Serin an Position 171 konsistent. Dasselbe gilt für die reisolierten Pseudorevertanten 1990CIII, für die beide Mutationen, C₁₇₁S sowie S₂₀₉C, bestätigt werden konnten. In zwei von vier der sequenzierten Pseudorevertanten fiel aber eine Mischsequenz an Position 210 auf, dem Codon direkt stromabwärts der Pseudoreversion. Die Sequenz wies gemischte Codone auf, die für Lysin und/oder Threonin kodierten. Im Ausgangsvirus 1990CIII war an dieser Position das Threonincodon zu finden, welches im Vergleich zur CSFV Alfort/Tübingen Sequenz bereits eine stille Mutation aufwies. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden die Sequenzen der verbleibenden positiven 1990CIII Virusanzuchten für 1990CIII überprüft (Tabelle 24). Für OM#50/5, welches als einziges Tier an 5, 7 und 9dpi Virus positiv war, konnte ein Shift der Sequenz von einer Mutation des Codons an Tag 5pi zu Lysin (AAA) über eine Mischpopulation von Lysin und Threonin (AMA) zurück zur in der Virusvariante 1990CIII codierten Originalsequenz für Threonin (ACA) an Tag 9pi nachgewiesen werden. Reisoliertes Virus aus OM#53/8 von Tag 5pi wies ebenfalls eine Mutation zu Lysin auf. Konstante Virussequenzen für Threonin 210 konnten für alle reisolierten Viren aus Tier OM#51/6 festgestellt werden. Diese direkt neben der Pseudomutation S₂₀₉C beobachteten Veränderungen sind vermutlich Mutationen, die bei der Replikation im Tier als Anpassung an die ausgetauschten AS des Codons 209 entstehen. Solche Varianten konnten in Zellkultur propagierten Virus nicht beobachtet werden. Die Variabilität dieses Codons scheint sich aber nicht über Selektion zu stabilisieren.

Tabelle 24: Codon 210 – Nukleotidtripletts in verschiedenen Virusreisolaten aus Leukozytenpräparationen verschiedener Blutentnahmetage.

In der Tabelle angegeben sind die gefundenen Nukleotidtripletts, die verwendete Virusanzucht sowie die Primer zur Sequenzierung.

OM#50/5	OM#51/6	OM#52/7	OM#53/8	RNA	Primer
AAA	ACA	-	AAA	5dpi	M348+
AMA	ACA	AMA	-	7dpi	M348+
AMA	ACA	AMA	AMA	7dpi	M348+
AMA	ACA	AMA	-	7dpi	Eo3SXba
ACA	ACA	AMA	AMA	7dpi	Eo3SXba
ACA	-			9dpi	M348+
ACA	-			9dpi	M348+

1.1.11. Serologische Untersuchung – Serumneutralisationstest

Für den Nachweis neutralisierender Antikörper wurden Serumneutralisationstests (SNT; III.2.3.5) durchgeführt. Die gewonnenen Seren der Tiere vor Infektion (-1dpi) sowie vom jeweiligen Endtag (7dpi/15dpi/21dpi) wurden unter Verwendung des Schweinepestvirus SP50 (Alfort/Tübingen) auf neutralisierende Antikörper untersucht. Von Tier #50/5 konnte aus technischen Gründen an Tag 10pi keine Serumprobe genommen. Alle Tiere, die an Tag 15pi respektive 21pi geschlachtet wurden, hatten nachweisbar neutralisierende Antikörper im Serum (Tabelle 25, Abbildung 9).

Tabelle 25: Reziproke Titer der neutralisierenden Antikörper gegen CSFV TV#61/13.

Mittelwerte der reziproken Titer neutralisierender Antikörper in Seren der Tiere getestet in Triplets in drei unabhängigen Untersuchungen gegen 100 KID₅₀ CSFV Alfort/Tübingen.

	Gruppe 1 - EP82/2				Gruppe 2 - 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTF III			
	46/1	47/2	48/3	49/4	50/5	51/6	52/7	53/8	54/9	55/10	56/11	57/12
-1dpi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7dpi							0					
15dpi										33	23	33
21dpi	114	166	1129	66		353		100	91			

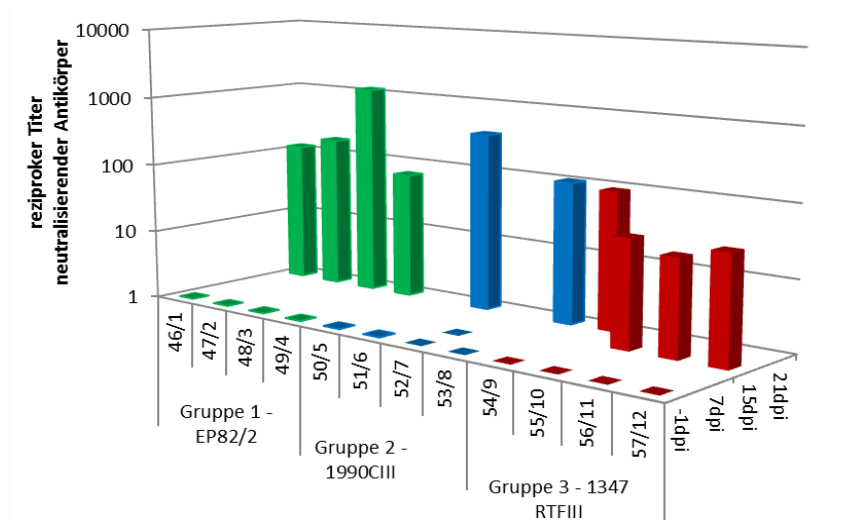


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Serumneutralisationstests TV#61/13.

Mittelwerte der reziproken Titer neutralisierender Antikörper in Seren der Tiere getestet in Triplets in drei unabhängigen Untersuchungen gegen 100 KID₅₀ CSFV Alfort/Tübingen.

1.1.12. Serologische Untersuchung – ELISA

Um ein genaueres Bild der Induktion von CSFV spezifischen Antikörpern durch die beiden Mutanten sowie das Wildtypvirus im Verlauf des Versuches zu erhalten, wurden Serum und Plasmaproben mit Hilfe des kommerziell erhältlichen IDEXX CSFV Ab ELISA (III.2.3.6) validiert. Hierfür wurden die zur Verfügung stehenden Serumproben (-1dpi, 15dpi & 21dpi) sowie Plasmaproben, der jeweiligen Blutentnahmetage in Duplikaten im „blocking ELISA“ nach Herstellerangaben geprüft. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, befinden sich an Tag 12pi die Testergebnisse dreier Tiere der ersten Gruppe (OM#46/1, 47/2, 48/3) bereits im fraglichen Bereich (30-40% Inhibierung) und überschreiten den „cut off“ (40%) an Tag 15pi. An denselben Tagen wurden die Tiere aus Gruppe 2 negativ getestet (OM#51/6, 12dpi) oder lagen im fraglichen Bereich (OM#51/6 15dpi, OM#53/8 12&15dpi). Erst das an Tag 21pi entnommene Serum dieser Tiere zeigte eine positive Reaktion für CSFV Antikörper. Ein ähnlicher Verlauf ergab sich aus den Werten der Wildtypgruppe. Hier kann man festhalten, dass nur Tier #54/9, welches das geplante Ende des Versuches erreicht hat, eine adäquate Menge an nachweisbaren Antikörpern aufwies und ab Tag 15pi im Plasma positiv getestet wurde. Für die restlichen Tiere dieser Gruppe lagen an Tag 15pi die Antikörperwerte im Plasma noch unter dem fraglichen Bereich. Das am selben Tage gewonnene Serum ergab fragliche Werte.

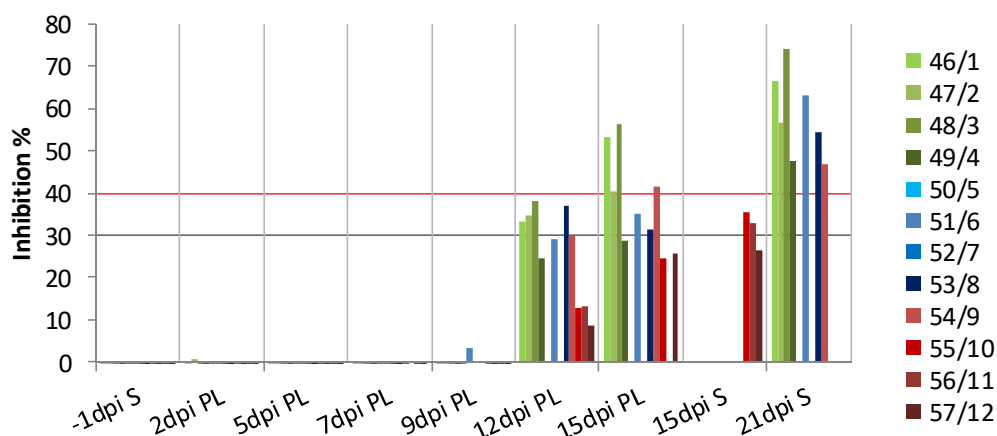


Abbildung 10: Ergebnisse des CSFV ELISA. Serum (S) und Plasma (PL) der Tiere wurden mittels IDEXX CSFV Ab ELISA getestet.

Die rote Linie gibt den positiven „Cut-off“ Wert von 40% an, die graue Linie (30%) markiert den fraglichen Bereich. Die Untersuchte Probenart ist für den jeweiligen Tag angegeben.

1.1.13. Zusammenfassung Pathogenitätsstudie I - #61/13

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten Ergebnisse vorausgegangener Studien. So löste die dimerisierungsnegative Variante EP82/2 im Tier kaum signifikante, unspezifische Symptome aus und kann deshalb als nahezu apathogen bewertet werden. Die Daten, für die mit der Pseudorevertante 1990CIII infizierten Tiere, stützen ebenfalls die Daten der vorausgegangenen Studie, welche dieses Virus mit deutlich ausgeprägten klinischen Anzeichen einer CSFV Infektion beschrieb. Somit ließen sich die Ergebnisse der vorausgegangenen Experimente in einer Studie reproduzieren. Der Vergleich der Pathogenität der drei untersuchten Virusvarianten lässt eine eindeutige Abstufung erkennen und somit die These untermauern, dass die Dimerisierung des E^{ns} entscheidend zur Virulenz von CSFV beiträgt. Dennoch lässt sich keine finale Schlussfolgerung aus diesem Versuch ziehen. Der Verlust von 50% der Tiere aus Gruppe 2 im Laufe des Versuches war zu gravierend und somit wurde die Pathogenitätsstudie wiederholt.

1.2. Pathogenitätsstudie II – TV #02/15

1.2.1. Charakterisierung der zu untersuchenden Viren

Die unter IV.1.1 beschriebenen Viren wurden erneut in SK6 Zellen vermehrt, titriert, sequenziert und in ihrem Wachstumsverhalten überprüft. Die Messung der Wachstumskinetik wurde dreimal wiederholt und ist in Abbildung 11 dargestellt. Die dimerisierungsnegative Virusvariante EP 82/2 bleibt im Wachstum ca. eine Logstufe hinter den beiden dimerisierungspositiven Viren der Pseudorevertante 1990CIII und dem Wildtyp 1347 RTFIII zurück.

Sequenzierung bestätigte die eingeführten Mutationen an Codonposition 171, die zum Austausch C171S führt, sowie die zusätzliche Mutation des Codons 209 (S₂₀₉C) in 1990CIII.

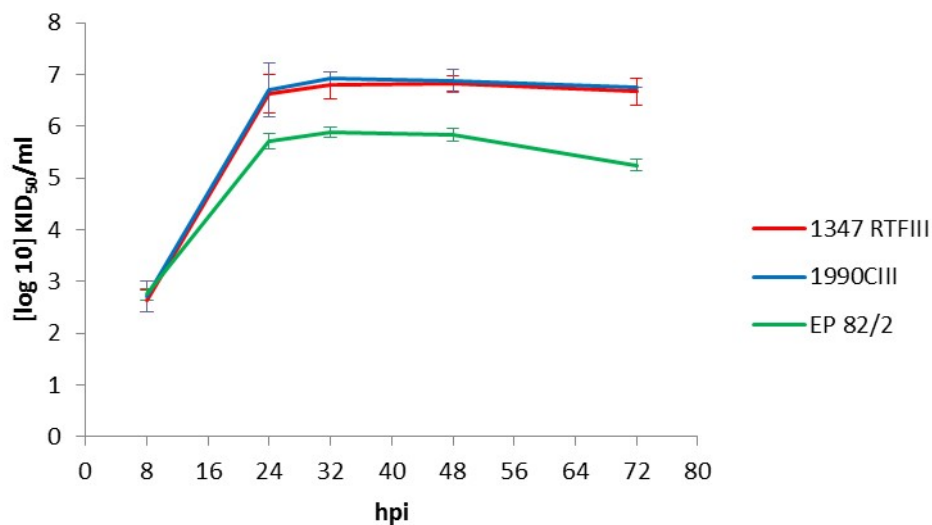


Abbildung 11: Wachstumskinetik der in TV#2/15 eingesetzten Viruspräparation mit Standardabweichung.

Die Kinetiken von EP 82/2 (5.Passage), 1990CIII (5.Passage) und 1347 RTFIII (3.Passage) wurde in SK6 Zellen durchgeführt.

1.2.2. Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Zwölf Tiere von ca. 20kg wurden acht Tage vor Infektion im Stallgebäude des Friedrich-Loeffler-Institutes eingestallt, um eine angemessene Akklimatisierungsphase zu gewährleisten. Angeliefert wurden die Tiere aus der Schweinezucht Alt Gaarz, Hohen Wangelin. Analog zur Pathogenitätsstudie I, wurden die Tiere auf drei Gruppen a vier aufgeteilt und entsprechend mit FLI Ohrmarken versehen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht zu Gruppen, Stallverteilung, eingesetzten Viren sowie internen Tiernummern für TV# 02/15

Gruppe	Stall	zu charakterisierendes Virus	Kennzeichnung
1	302	EP 82/2 (5. Passage, dimerisierungsnegativ)	#1-4
2	308	1990C III (5. Passage, dimerisierungspositiv)	#9-12
3	312	1347 RTF III (3. Passage, Wildtyp, dimerisierungspositiv)	#5-8

1.2.3. Zeitplan und Probenentnahme

Analog zur Pathogenitätsstudie I #61/13 wurden die Tiere ab -2dpi täglich bis zum Ende der Studie beobachtet, der Gesundheitszustand bewertet (III.2.2.3) und die Körpertemperatur (III.2.2.4) bestimmt. Blutproben (III.2.2.5) wurden anhand des vorliegenden Plans entnommen. Diese wurden entsprechend der geplanten Verwendung aufgearbeitet und bei -70°C zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die Aufarbeitung der Leukozytenpräparationen (III.2.3.2) wurde für die Proben 5-9dpi durchgeführt. Auf Grund der Ausprägtheit der klinischen Symptomatik wurden die Wildtypvirus-infizierten Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen an den Tagen 7pi Tier OM#7, 16dpi OM#5 sowie 19dpi die Tiere OM#6 und #8 getötet (III.2.2.6). Die Tiere der Gruppen 1 und 2 erreichten das planmäßige Ende der Studie an 21dpi (Tabelle 27).

Tabelle 27: Zeitplan und Probennahme TV#02/15

Tage nach Infektion	Maßnahmen/ Parameter/ Proben				
	Klinische Beurteilung	Körper-temperatur	Heparinblut (Leukozyten-zählung, Plasma)	Serum	Schlachtung
-2 dpi	x	x			
-1 dpi	x	x	x	x	
0 dpi	x	x			
1 dpi	x	x			
2 dpi	x	x	x		
3 dpi	x	x			
4 dpi	x	x			
5 dpi	x	x	x (+BC)		
6 dpi	x	x			
7 dpi	x	x	x (+BC)		
8 dpi	x	x	#7 (+BC)	#7	#7
9 dpi	x	x	x (+BC)		
10 dpi	x	x			
11 dpi	x	x			
12 dpi	x	x	x		
13 dpi	x	x			
14 dpi	x	x			
15 dpi	x	x	x		
16 dpi	x	x	#5	#5	#5
17 dpi		x			
18 dpi		x			
19 dpi	x	x	#6/#8	#6/#8	#6/#8
20 dpi	x	x			
21 dpi		x	x	x	x

1.2.4. Infektion und Rücktitration der eingesetzten Viren

Die Infektion der Tiere mit den zu beurteilenden Viren, EP 82/2 fünfte Passage, 1990CIII fünfte Passage sowie 1347 RTFIII dritte Passage fand an Tag 0 statt. Die in einem Gesamtvolumen von 1,5ml DMEM aufgenommene Dosis von 10^6 KID₅₀ wurde den Tieren i.m. in den Musculus brachiocephalicus appliziert. Zur Kontrolle wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsprozesses jeweils 1ml der Virussuspension einbehalten und titriert (III.2.2.2).

Tabelle 28: Rücktitrationen der zurückgestellten Virussuspensionen TV#02/15

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
	EP#82/2 (Dimerisierungs negativ)		1990CIII (Dimerisierungs positiv)		1347 RTF III (Wildtyp, Dimerisierungs positiv)	
	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)	Titer in Rücktitration (KID ₅₀ / ml)	erwarteter Titer (KID ₅₀ / ml)
I) Originalvirus (direkt nach Auftauen auf -70°C)	$10^{5,75}$	$10^{5,8125}$	10^7	$10^{6,8125}$	$10^{6,75}$	$10^{7,0625}$
II) 1. Verdünnung (direkt auf -70°C)	x	x	10^6	$10^{5,824}$	$10^{5,75}$	$10^{5,824}$
III) 1. Verdünnung (nach Stalltransport auf -70°C)	$10^{5,75}$	$10^{5,8125}$	$10^{5,875}$	$10^{5,824}$	$10^{5,625}$	$10^{5,824}$
Effektive Dosis (Rücktitration III)	$10^{5,926}$	10^6	$10^{6,05}$	10^6	$10^{5,80}$	10^6

Die ermittelten Titer der Rücktitration der verschiedenen Arbeitsschritte entsprechen annähernd den erwarteten Titern (Tabelle 28). Testübliche Schwankungen machen geringe Abweichungen möglich. Die errechnete effektive Dosis, bezogen auf Rücktitration III nach Stalltransport, ergibt Mindestmengen an Virus, die der geplanten Dosis pro Tier sehr nahe kommen. Für beide zu untersuchenden Viren liegt dieser Titer oberhalb dem ermittelten Titer des Wildtypvirus.

1.2.5. Klinische Punktzahl

Ab Beginn des Versuches wurde täglich der Gesundheitszustand der Tiere überwacht und mit Hilfe des Schemas von MITTELHOLZER et al. (2000) hinsichtlich der Schweinepestsymptomatik beurteilt. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der jeweiligen Gruppen sowie die Mittelwerte der Gruppen dargestellt.

In Gruppe 1 induzierte das attenuierte, dimerisierungsnegative Virus EP 82/2, nur sehr milde, unspezifische Symptomatik in Form von leicht geröteten Konjunktiven und einer etwas eingefallenen Körperform. Eine etwas ausgeprägtere Symptomatik in dieser Gruppe wies OM#4 auf. Dieses Tier zeigte ein reduziertes Allgemeinbefinden, einen gekrümmten Rücken während des Aufstehens sowie einen dünnen Kot zwischen Tag 9-12pi. Ähnliche Befunde gibt es für die mit der Pseudorevertante infizierten Tiere. Alle Tiere zeigten sich, in etwas unterschiedlicher Ausprägung, reduziert in ihrer Lebhaftigkeit und Futteraufnahme sowie mit einer veränderten Kotqualität in der Zeitspanne von Tag 6-13pi. Deutliche Symptomatik konnte in der Wildtypgruppe beobachtet werden. Mit steigender Tendenz konnten ab Tag 5pi Veränderungen festgehalten werden. OM#7 musste bereits an Tag 7pi wegen der Schwere der Symptomatik getötet werden. Dieses Tier war an Tag -1pi nach einer ausgeprägten Stressreaktion, deutlich erhöhter Atemfrequenz und verlängerter Regenerationsphase nach dem Bluten bereits aufgefallen. Diese Beobachtungen und der Verdacht auf eine Vorbelastung des Tieres wurde durch die pathologische Untersuchung bestätigt (IV.1.2.8). Im Verlauf des Versuches verschlechterte sich auch der Zustand der restlichen Tiere dieser Gruppe, sie zeigten sich deutlich reduziert in ihrem Allgemeinbefinden mit ausgeprägtem Durchfall. An Tag 16pi (OM#5) bzw. 19pi (OM#6 und #8) erreichten die Tiere jeweils Endpunktkriterien und wurden geschlachtet.

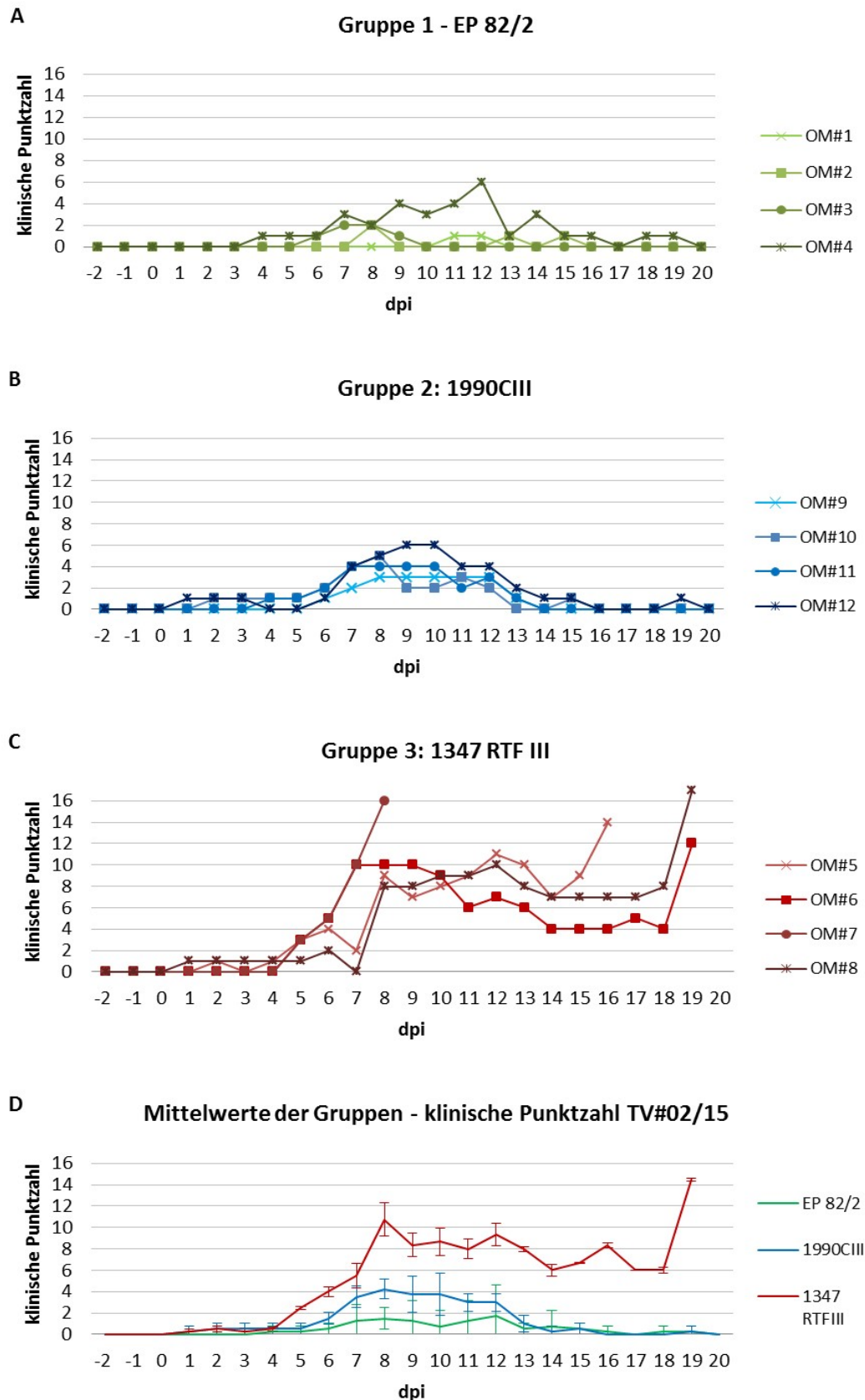


Abbildung 12: klinische Punktzahlen der Gruppen 1-3 TV#02/15.

(A-C) Punktzahlen der Tiere aus den verschiedenen Gruppen. (D) Mittelwerte der Gruppen mit Standardabweichung zum Vergleich.

In der Übersicht der Mittelwerte der klinischen Punktzahl (Abbildung 9D) ergibt sich eine deutliche Abstufung der klinischen Ausprägung der drei Virusvarianten.

1.2.6. Körpertemperatur

Rektale Körpertemperaturen wurden ab Tag -2pi bis zum Ende des Versuchs festgehalten. Einen deutlichen Anstieg der Temperatur gab es in der Wildtypgruppe zu verzeichnen, hier stieg die Temperatur der Tiere bis zu Maximalwerten von 41,8°C. Die Auswertung der Temperaturkurven, der mit 1990CIII infizierten Gruppe 2, zeigte weniger deutliche Anstiege der Temperatur, dafür aber für alle Tiere, besonders an Tagen 5, 7 sowie 11pi. Am Ende des Versuchs lagen die Temperaturen immer noch an der Grenze zum unphysiologischen Bereich. In Gruppe 1 stiegen die Temperaturen der Tiere ab Tag 6-12pi vereinzelt in den unphysiologischen Bereich. Besonders auffällig waren hier OM#1 und #2. OM#1 zeigte im Verlauf des Versuches ab Tag 2pi immer wieder eine Erhöhung der Temperatur bis zum Ende des Versuches. Im Mittel ist die Temperatur der gesamten Gruppe aber nur an den Tagen 9 und 10pi leicht erhöht und normalisieren sich bis zum Ende des Versuchs (Abbildung 13).

1.2.7. Leukozytenzahlen

Aus den EDTA Blutproben der Tiere wurden die Leukozytenwerte mit dem Sysmex XT-2000iV Blutanalysegeräte bestimmt. Für alle Gruppen lässt sich an Tag 5pi der typische Abfall der Leukozyten beobachten. In Gruppe 1 und 2 normalisieren sich die Werte wieder bis zum Ende der Studie. Es ist zu erwähnen, dass für OM#5 an Tag 5pi kein Leukozytenwert aus dem gewonnenen Blut zu ermitteln war. Bei diesem Tier ist der Abfall in den Werten von Tag 2pi zu Tag 7pi eindeutig nachzuvollziehen (Abbildung 14).

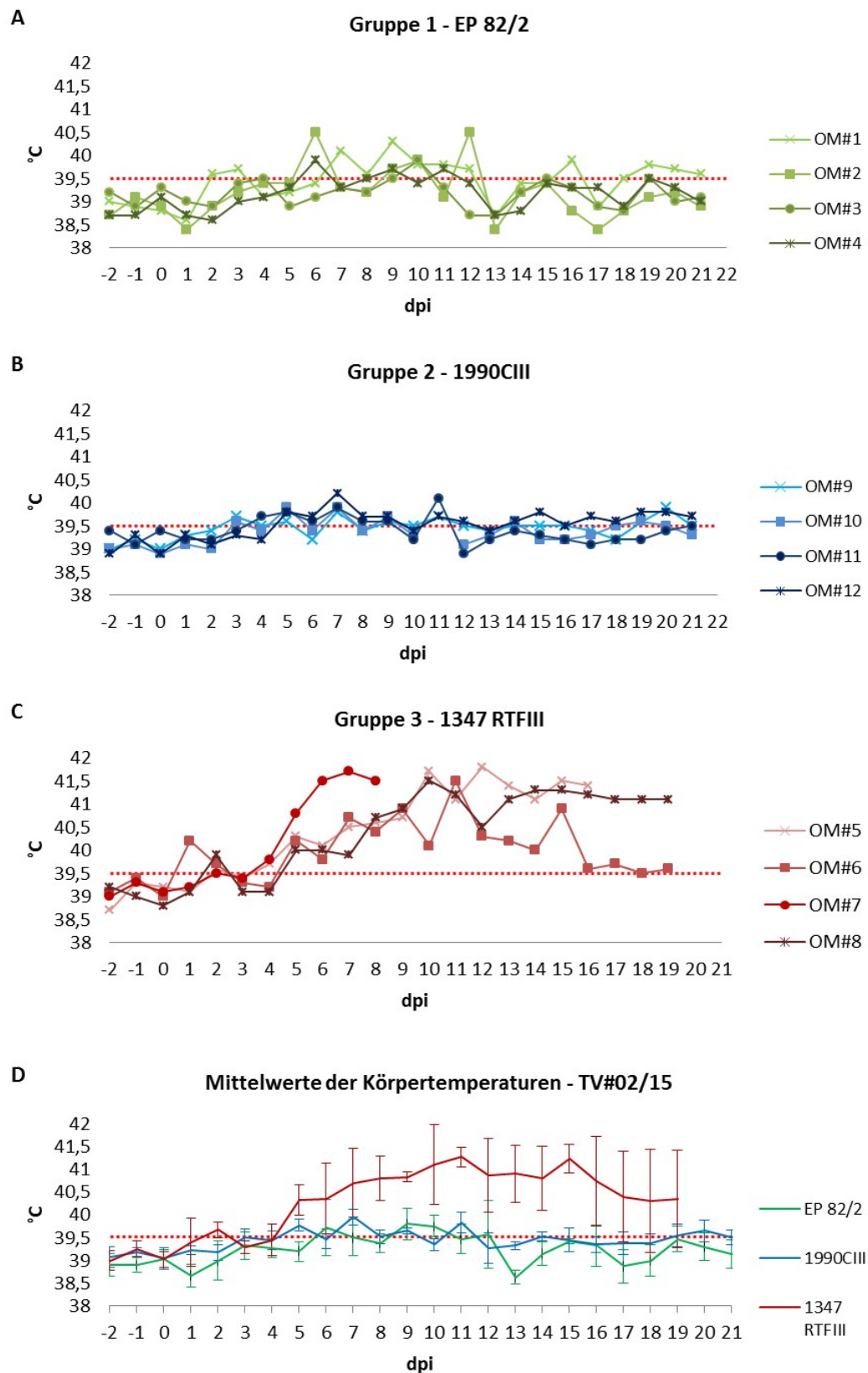


Abbildung 13: Körpertemperaturen der Tiere im Verlauf des Versuchs.

(A-C) Körpertemperaturen der Einzeltiere nach Gruppen getrennt.

(D) Körpertemperaturen der Gruppen im Durchschnitt mit Standardabweichung. Die gestrichelte rote Linie markiert die Grenze der physiologischen Temperatur.

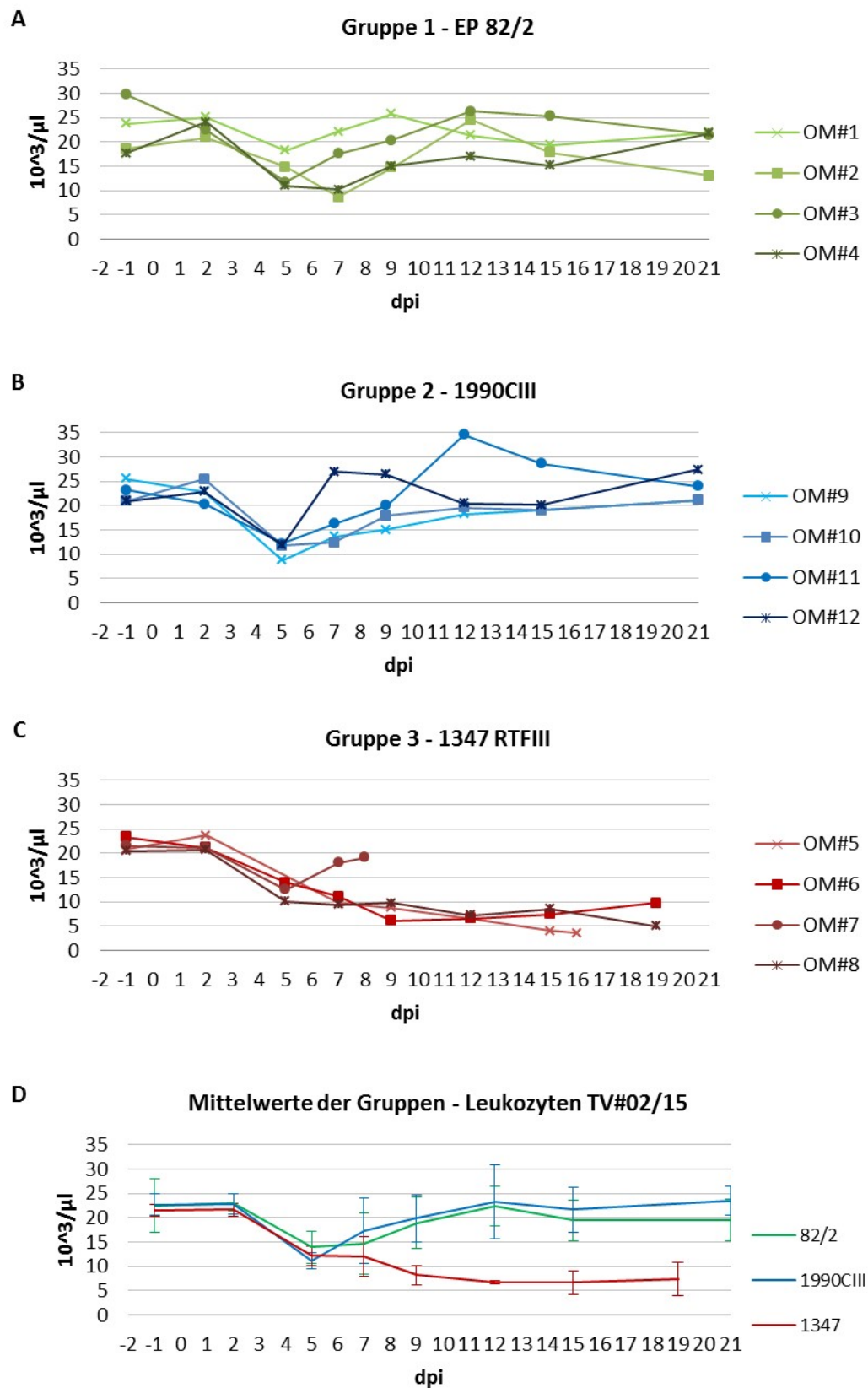


Abbildung 14: Leukozytenzahlen.

(A-C) Leukozytenzahlen jedes einzelnen Tieres der verschiedenen Gruppen. (D) Übersicht über den Verlauf der Leukozyten in den Gruppen mit Standardabweichung. Leukozytenzahlen wurden ermittelt mittels Sysmex XT-2000iV aus EDTA Blut.

1.2.8. Pathologie


Im Anschluss an die Schlachtung der Tiere fand jeweils die pathologische Untersuchung statt. In der Sektion wiesen die Tiere der Gruppen 1 und 2 keinerlei Befunde auf. Die Tiere der Gruppe 3 zeigten unterschiedliche Ausprägungen an pathologischen Befunden. OM#7, welches bereits an Tag 7pi untersucht wurde, zeigte eine generalisierte Lymphknotenschwellung mit hämorrhagischer Infarzierung. Des Weiteren war ein Fibrin verklebter linker Lungenflügel auffällig, was auf eine Vorerkrankung schließen lässt, passend dazu war dieses Tier nach dem Bluten an Tag -1 durch verstärkte Atmung aufgefallen. Diese Vorbelastung erklärt den deutlich ausgeprägten, schnellen Krankheitsverlauf. Weitere Befunde der Tiere dieser Gruppe (OM#5, OM#6 und OM#8), erhoben bei den Sektionen an Tag 15 und 19, waren generalisierte Lymphknotenschwellungen sowie vereinzelte Petechien auf der Niere (OM#8) und Petechien in der Harnblasenschleimhaut. Auffällig bei der Sektion der Tiere an Tag 19pi war der deutlich Gewichtsunterschied der beiden Tiere, mit einem Schlachtgewicht von 19kg (OM#8) zu 27kg (OM#6). Bei der Untersuchung fiel ein komplett gefüllter Magen des Tieres #6 auf. Während der Beobachtung und Erhebung der klinischen Punktzahl war auch bei diesem Tier das kaum vorhandene Interesse am angebotenen Futter mit in die Beurteilung eingeflossen, dies kann nach der pathologischen Untersuchung auf den vollen Magen und nicht auf Fressunlust auf Grund der Erkrankung zurückgeführt werden.

1.2.9. Virusnachweis durch real-time RT-PCR

Die EDTA Blutproben wurden via real-time RT-PCR auf die vorhandene Menge an CSFV Genom untersucht. In Tabelle 29 sind die ΔC_t Werte der einzelnen Tiere aufgeführt. Dieser Nachweis war für fast alle Tiere positiv, einzig für OM#1, infiziert mit EP 82/2, ließ sich keine virale RNA im Blut und somit auch keine Virämie nachweisen. Die Viruslast im Blut der Tiere ist in diesem Versuch mit minimal erreichtem ΔC_t Werten von 25,77 (OM#8, 15dpi, Gruppe 3) nicht so ausgeprägt wie im vorangegangenen Versuch #61/13. In den beiden Gruppen, infiziert mit den Mutanten, liegen die ΔC_t Werte deutlich höher mit minimal

Werten von 35,65 (OM#4, 9dpi, Gruppe 1) und 32,85 (OM#11/ 7dpi, Gruppe 2) (Tabelle 29).

Tabelle 29: Virusnachweis mittels real-time RT-PCR.

Δ Ct-Werte der Einzeltiere im Versuchsverlauf. - negatives Ergebnis,  keine Probe.

	Gruppe 1 - EP82/2				Gruppe 2 - 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTFIII					
	OM#	OM#	OM#	OM#	OM#	OM#1	OM#1	OM#1	OM#	OM#	OM#	OM#		
	1	2	3	4	9	0	1	2	5	6	7	8		
-1dpi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2dpi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5dpi	-	37,71	37,52	-	-	35,40	32,95	37,16	33,76	36,26	36,11	34,35		
7dpi	-	35,76	38,02	36,75	35,32	35,65	32,85	37,89	32,24	30,03	30,14	32,01		
8dpi									28,15					
9dpi														
9dpi	-	35,67	-	35,65	-	35,70	34,57	-	27,48	29,61				
12dpi	-	37,68	-	-	-	-	36,98	-	27,57	28,33			26,49	
15dpi	-	-	-	-	-	-	36,64	-	27,22	29,57				
16dpi									27,04					
19dpi														
21dpi	-	-	-	-	-	-	-	-	28,60					
											26,27			

In Abbildung 15 sind die Durchschnittswerte der Gruppen zum besseren Vergleich grafisch aufgearbeitet. Trotz der niedrigeren Viruslast im Blut der Tiere ließ sich auch hier die Abstufung zwischen den drei Gruppen deutlich nachvollziehen. Während Gruppe 1 schon an 5dpi in den Werten hinter den beiden dimerisierungspositiven Varianten zurückblieb, wurde der Unterschied zwischen der Pseudorevertante und dem Wildtypvirus erst an Tag 7pi deutlich. Beide Mutanten waren zum Ende des Versuchs unter die Nachweisgrenze gefallen, während die Δ Ct-Werte in der Wildtypgruppe konstant auf dem Plateau blieben.

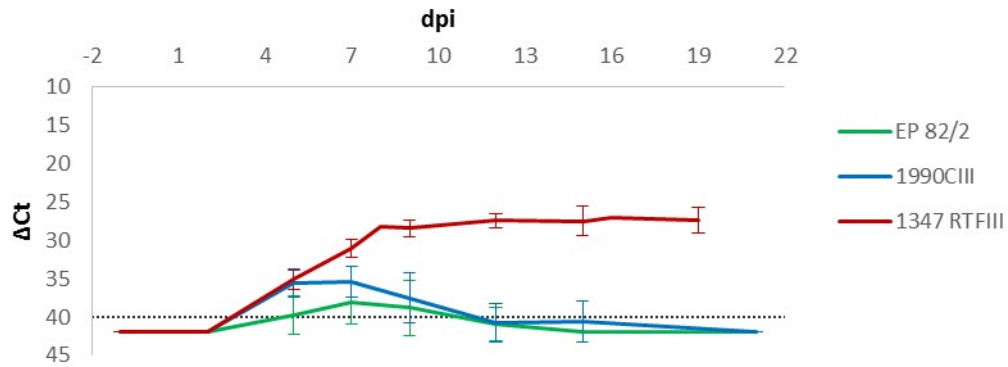


Abbildung 15: Ergebnisse der real time RT-PCR im Gruppenkontext mit Standardabweichung.

Die gestrichelte Linie markiert den negativen Bereich > 40.

1.2.10. Virusanzucht aus Leukozytenpräparationen in Zellkultur zur Überprüfung der Stabilität der Mutationen

Zur Überprüfung der Stabilität der eingeführten Mutationen sowie zur Detektion möglicher Reversionen oder weiterer Mutationen, wurden aus den Leukozytenpräparationen Virus in Zellkultur reisoliert und untersucht (III.2.3.3).

Im ersten Schritt wurde die Infektion von SK6 Zellen und damit das Vorhandensein von infektiösem Virus in den Präparationen via indirekter Immunfluoreszenz mit dem mAk A18 überprüft. Die Ergebnisse für die einzelnen Tiere sind in Tabelle 30 dargestellt. Auch hier ließ sich kein positives Ergebnis für OM#1 erzielen.

Tabelle 30: Virusnachweis aus Leukozytenkonzentrat in Zellkultur im Doppelansatz.

Farblich unterlegte Virusanzuchten wurden zur weiteren Untersuchung per RT-PCR und Sequenzierung ausgewählt.

	Gruppe 1 - EP 82/2				Gruppe 2 - 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTFIII			
	OM #1	OM #2	OM #3	OM #4	OM #9	OM #10	OM #11	OM #12	OM #5	OM #6	OM #7	OM #8
5dpi	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	-/-		+/+	+/+	+/+
7dpi	-/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8dpi											+/+	
9dpi	-/-	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+		+/+

Viruspositive Proben von 7dpi, in Tabelle 30 grau unterlegt, wurden ausgewählt, mit diesen erneut Zellen für die Gewinnung von RNA infiziert, aufgearbeitet und das E^{rns}-Gen via RT-PCR amplifiziert. Mit dem Primer M348+ wurde das gewonnene PCR Produkt sequenziert. Die eingeführten Mutationen C₁₇₁S in EP 82/2, sowie C₁₇₁S und S₂₀₉C in 1990CIII konnten bestätigt werden. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Threonincodon 210, welches im vorangegangenen Versuch durch Inkonsistenz aufgefallen war (Tabelle 24). Zusätzlich wurden positive Virusanzuchten aus Proben der beiden anderen Blutentnahmetage 5 und 9dpi (in Tabelle 30 blau unterlegt) untersucht. Die E^{rns}-Sequenz wies in diesem Bereich erneut eine Inkonsistenz der Codon 210 Sequenz auf (Tabelle 31). Eine daraus resultierende Mischpopulation aus Threonin und Lysin an Position 210, wie im vorherigen Versuch, konnte nur für das reisolierte Virus OM#11 7dpi nachgewiesen werden. Die zu den beiden anderen Zeitpunkten aus Tier #11 isolierten viralen RNAs codierten an Position 210 für das in 1990CIII vorhandene Threonin, dies gilt auch für alle an Tag 5pi isolierten Viren. Im Gegensatz zum letzten Versuch konnte für alle anderen reisolierten Viren eine Mutation des Codons 210 zu Lysin beobachtet werden.

Tabelle 31: Sequenzen des Codons 210 in reisolierter RNA aus 1990CII infizierten Tieren nach RT-PCR und Sequenzierung mit M348+.

OM#9	OM#10	OM#11	OM#12	RNA
ACA	ACA	ACA	-	5dpi
AAA	AAA	AMA	AAA	7dpi
AAA	AAA	ACA	-	9dpi

Um auszuschließen, dass die deutlichere klinische Ausprägung des mit EP82/2 infizierten Tieres #4 auf eine mögliche Pseudoreversion zurückzuführen war, wurden auch hier zusätzliche reisolierte Viren der beiden anderen Tage, 5 und 9dpi überprüft (in Tabelle 30 grün unterlegt). Alle reisolierten Viren waren an Position 171 in ihrer Sequenz stabil und wiesen keine weiteren Mutationen auf.

1.2.11. Serologische Untersuchung – Serumneutralisationstest

Eine weitere Möglichkeit, die erfolgreiche oder protrahierte Infektion mit CSFV nachzuweisen, ist die Detektion neutralisierender Antikörper via Serumneutralisationstest (III.2.3.5). Seren von Tag -1pi sowie vom jeweiligen Schlachttag (OM#7 8dpi, OM#5 16dpi, OM#6, OM#8 19dpi, und 21dpi für die Tiere der Gruppen 1 und 2) wurden hierfür auf neutralisierende Antikörper gegen SP50 untersucht. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Analysen ist in Tabelle 32 und Abbildung 16 dargestellt. In allen Seren ab Tag 19pi sind neutralisierende Antikörper nachweisbar. Die deutliche Antikörperantwort in OM#1 bestätigt die erfolgreiche Infektion dieses Tieres mit EP 82/2. Es scheint, wie in TV#61/13, im Vergleich der Titer neutralisierender Antikörper der Gruppen untereinander, eine bessere Immunantwort in den Tieren zu geben, die mit der dimerisierungsnegativen Variante infiziert waren, als in der Gruppe, die mit der Pseudorevertante 1990CIII infiziert wurde. In dieser Gruppe zeigte ein Tier eine recht gute Immunantwort im Gegensatz zu drei Tieren mit geringeren Titern (<100). Das Verhältnis in Gruppe 1 ist umgekehrt: drei mal eine gute Induktion neutralisierender Antikörper zu einer etwas schwächeren aber dennoch soliden Antikörperantwort gegen EP 82/2. Dass die Induktion der Antikörper nicht nur vom Virus, sondern auch von der Immunkompetenz des jeweiligen Tiers abhängig ist, zeigt die gute Serokonversion von OM#6 an Tag 19pi. Die restlichen Tiere der Kontrollgruppe wiesen geringe (OM#8, 19dpi), kaum detektierbare (OM#5, 16dpi) oder keine (OM#7, 8dpi) Antikörpertiter im Serum auf. (Abbildung 16, Tabelle 32)

Tabelle 32: reziproke Titer der neutralisierenden Antikörper gegen CSFV TV#02/15.

Mittelwerte der reziproken Titer neutralisierender Antikörper in Seren der Tiere getestet in Triplets in drei unabhängigen Untersuchungen gegen 100KID₅₀ CSFV Alfort/Tübingen.

	Gruppe 1 - EP82/2				Gruppe 2 - 1990CIII				Gruppe 3 - 1347 RTFIII			
	OM #1	OM #2	OM #3	OM #4	OM #9	OM #10	OM #11	OM #12	OM #5	OM #6	OM #7	OM #8
-1dpi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8dpi							0				0	
16dpi									>2,5			
19dpi										188		19
21dpi	296	225	124	331	36	212	94	21				

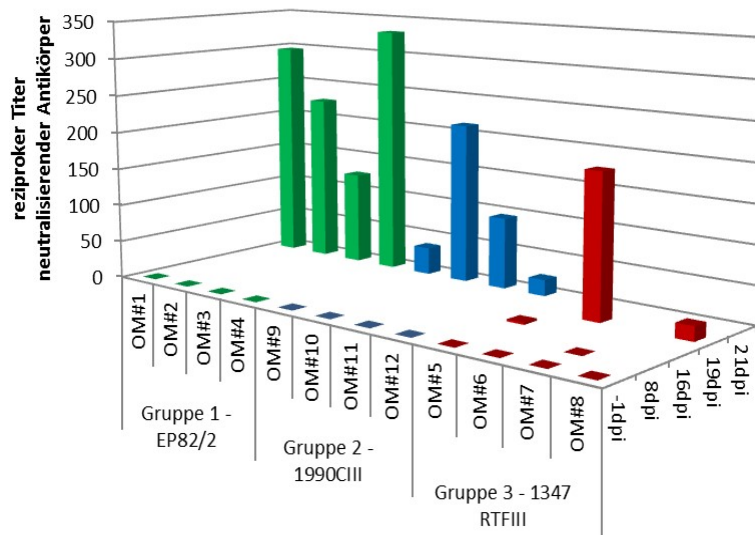


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Serumneutralisationstests zum TV#02/15.

Mittelwerte der reziproken Titer neutralisierender Antikörper in Seren der Tiere getestet in Triplets in drei unabhängigen Untersuchungen gegen 100 KID₅₀CSFV Alfort/Tübingen (SP50).

1.2.12. Serologische Untersuchung – ELISA

Die Untersuchung der Induktion CSFV spezifischer Antikörper in den einzelnen Gruppen mit dem IDEXX CSFV Ab ELISA ergab in diesem Versuch eine leichte Abstufung zwischen den Gruppen. An Tag 12pi zeigte sich für zwei von vier Tieren aus der ersten Gruppe bereits ein fragliches Ergebnis mit einer Blockierung über 30% (OM#1 und OM#2). Alle anderen Tiere im Versuch wiesen an diesem Tag noch Inhibition unterhalb des testeigenen „cut offs“ auf. Erst an Tag 15 relativierte sich dieses Bild, indem jeweils ein Tier aus Gruppe 1 (OM#1) und Gruppe 2 (OM#11) positiv getestet wurden. Im fraglichen Bereich befanden sich zwei Tiere der Wildtypgruppe (OM#5 und OM#6), zwei Tiere der 1990CIII infizierten Gruppe (OM#9 und OM#10) sowie ein Tier der Gruppe 1 (OM#2). Die Proben der restlichen Tiere aus Gruppe 1 ergaben erst zu Studienende positive Ergebnisse. An diesem Tag, 21dpi, wurden alle Tiere der mit EP 82/2 infizierten Gruppe mit Werten über 40% getestet. In Gruppe 2 kann man diese Aussage nicht treffen: hier überschritten nur 2 Tiere (OM#9 und OM#11) deutlich den „cut off“ im „blocking ELISA“, während OM#10, mit einer Inhibition von 40,35

durch die enthaltenen Antikörper an der Grenze zwischen positiv und fraglich lag. Das letzte Tier dieser Gruppe blieb selbst an Tag 21pi im fraglichen Bereich. In der Wildtypvirusgruppe wurde OM#6 bereits an Tag 19dpi deutlich positiv für bindende Antikörper getestet (Abbildung 17).

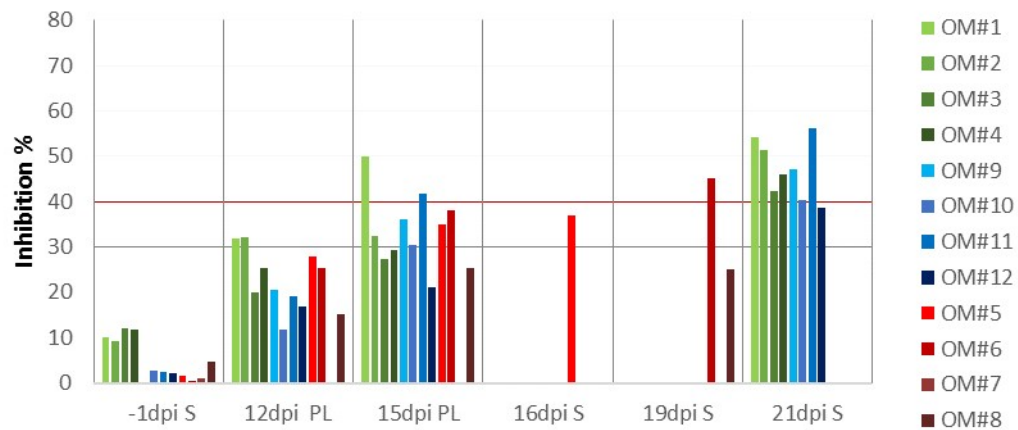


Abbildung 17: Ergebnisse des CSFV ELISA. Serum (S) und Plasma (PL) der Tiere wurden mittels IDEXX CSFV Ab ELISA getestet.

Die rote Linie markiert den positiven „cut-off“ Wert von 40%, die graue Linie (30%) den fraglichen Bereich. Die Untersuchte Probenart ist für den jeweiligen Tag angegeben.

1.2.13. Zusammenfassung Pathogenitätsstudie II – TV #02/15

Diese Studie führte zum Ergebnis, dass auch in diesem Versuch die dimerisierungsnegative Virusmutante EP 82/2 einen deutlich attenuierten Phänotyp im Schwein zeigte. Virus 1990CIII, welches durch Pseudoreversion wieder E^{rns} Dimere bilden kann, führte zu einer höheren Viruslast im Blut sowie zu einer ausgeprägteren Symptomatik als die attenuierte Variante in Gruppe 1. Die Virulenz des Ausgangsvirus 1347 RTFIII wurde von der Pseudorevertante nicht erreicht. Dennoch war eine Abstufung der drei untersuchten Viren deutlich auszumachen und unterstützte somit die These, dass die Dimerisierung des E^{rns} ein wichtiger Faktor für die Virulenz von CSFV ist.

2. Epitopkartierung

Ziel vieler Ansätze zur Vakzineentwicklung der letzten Jahre war es, Impfstoffe zu entwickeln, welche ein Markierungskonzept enthalten, um nach dem DIVA-Prinzip (**D**ifferentiation between **I**nfected and **V**accinated **A**nimals) einen Eintrag von Wildtypvirus in einem geimpften Bestand identifizieren zu können. Ein Ansatz dazu ist die Veränderung konservierter dominanter Epitope des Virus als Basis für eine serologische Differenzierung. Für diese Strategie ist es erforderlich, entsprechende geeignete Epitope zu kennen.

2.1. Kartierung des Epitopes des panpesti mAk Code4

Der panpesti monoklonale Antikörper Code4 wurde gegen den BVDV-Stamm Singer hergestellt (entspricht 8.12.7; CORAPI et al., 1990b) und erkennt alle bisher bekannten Pestiviren. Code4 richtet sich gegen das Nichtstrukturprotein NS3, welches innerhalb der Pestivirusfamilie aufgrund seiner für die Virusreplikation essentiellen enzymatischen Aktivität hoch konserviert ist. Im Tier wird eine solide Immunantwort gegen NS3 induziert und somit ist dieses Protein ein potentieller Kandidat für Markierungskonzepte.

2.1.1. Eingrenzung der Binderegion mit Hilfe von Deletionsbibliotheken

Um die Lokalisation des Code4 Epitopes zu identifizieren, wurden NS3-Expressionsplasmide generiert. Die codierenden Sequenzen für das NS3-Protein von BVDV CP7 sowie CSFV Alfort/Tübingen wurde mittels PCR (III.2.4.1.1.1, Primer: CP7-NS3/CP7-NS3rev, Alfort-NS3/Alfort-NS3rev) amplifiziert und über die in den Primern enthaltenen Restriktionsenzymchnittstellen NcoI und XbaI in den Vektor pCITE2a eingesetzt. Der Expressionvektor pCITE2a, auf dem alle im folgenden beschriebenen Expressionskonstrukte basieren, enthält einen T7-Promotor gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) aus dem EMCV-Genom, sowie der anschließenden Insertionsregion für Fremdgene. Diese enthält eine Vielzahl an Restriktionsenzymchnittstellen (multiple cloning site). Zusätzlich enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenz. Die so generierten parentalen Konstrukte pAT1 (CP7 NS3) und pAT2 (Alfort/Tübingen NS3) wurden jeweils sequenziert und in BHK-21 Zellen mit Hilfe des Vacciniavirus MVA T7 transient exprimiert. Mittels anschließender Immunfluoreszenz (IF) mit dem mAk

Code4 konnte das exprimierte Protein detektiert werden. Basierend auf diesen beiden Konstrukten wurden Deletionsbibliotheken erstellt, die für die erste Eingrenzung der Lokalisation des Epitops auf natürlich vorkommenden Restriktionsenzymchnittstellen beruhten.

Für Alfort/Tübingen wurden so vier unterschiedlich lange carboxyterminale sowie eine aminoterminal Deletion eingeführt. In Abbildung 18A repräsentieren die blauen Balken die verbleibende NS3 Region. Für die carboxyterminalen Deletionen wurde pAT2 zuerst mit SbfI linearisiert, weil die XbaI Restriktionsstelle, die bei der Klonierung verwendet wurde, aufgrund von Dam-Methylierung nicht zur Verfügung stand. Anschließend erfolgte die Spaltung mit dem jeweiligen zweiten Enzym. Die Deletion des N-Terminus erfolgte mittels einer Doppelspaltung. Im Anschluss wurden die Überhänge aufgefüllt bzw. abgespalten und das Plasmid religiert (III.2.4.1.2, III.2.4.1.5). Die Plasmide wurden zur Transformation von kompetenten Bakterienzellen verwendet, aus diesen nach Vermehrung isoliert und sequenziert. Die generierten Plasmide wurden so auf die eingeführte Deletion sowie auf potentielle Leserasterverschiebungen überprüft. Das Stoppcodon in den für die c-terminalen Deletionen kodierenden Konstrukten befindet sich nicht direkt am Ende des für NS3 kodierenden Bereiches, sondern etwas weiter stromabwärts im Plasmid. Somit hängen dem NS3-Teilprotein zusätzlich nicht zum NS3 gehörende AS an, welche im Schema im unteren Teil mit den grauen Balken dargestellt wurden.

In Abbildung 18B ist das Deletionsschema für pAT1, CP7 NS3, dargestellt. pAT3-pAT6, pAT11, pAT12 sowie pAT14 wurden analog zu den Alfort/Tübingen Konstrukten mittels Restriktionsenzymsspaltung generiert. Zusätzliche Deletionen vom N-Terminus aus (pAT15-17) sowie eine weitere Deletion des C-Terminus (pAT18) wurden zur weiteren Eingrenzung mittels PCR und in den Primer integrierten NcoI bzw. NheI Schnittstelle generiert (Bezeichnung der verwendeten Primer: pAT15: AT4 _CP7-NS3, pAT16: AT5_ CP7-NS3, pAT17: AT6_CP7-NS3, pAT18: AT7_CP7-NS3rev). Als jeweiliger Sense bzw. Antisense Primer wurde CP7-NS3 oder CP7-NS3rev verwendet. Diese Klone wurden ebenfalls im transienten System exprimiert und die erhaltenen Proteine auf

Interaktion mit Code4 überprüft. Ausgehend von den ersten Ergebnissen der Deletionsbibliotheken wurde ein weiteres, von beiden Seiten verkürztes CP7-NS3-Fragment erstellt. Die n-terminale und c-terminale Deletion wurden ausgehend von den Fragmenten gewählt, die noch positive Reaktion mit dem mAK ergaben. Für dieses Konstrukt, pAT19, wurde mit den Primern AT4_CP7-NS3 und AT7_CP7-NS3rev ein PCR-Fragment generiert und mittels NcoI und NheI in pCITE2a eingefügt (Abbildung 18B).

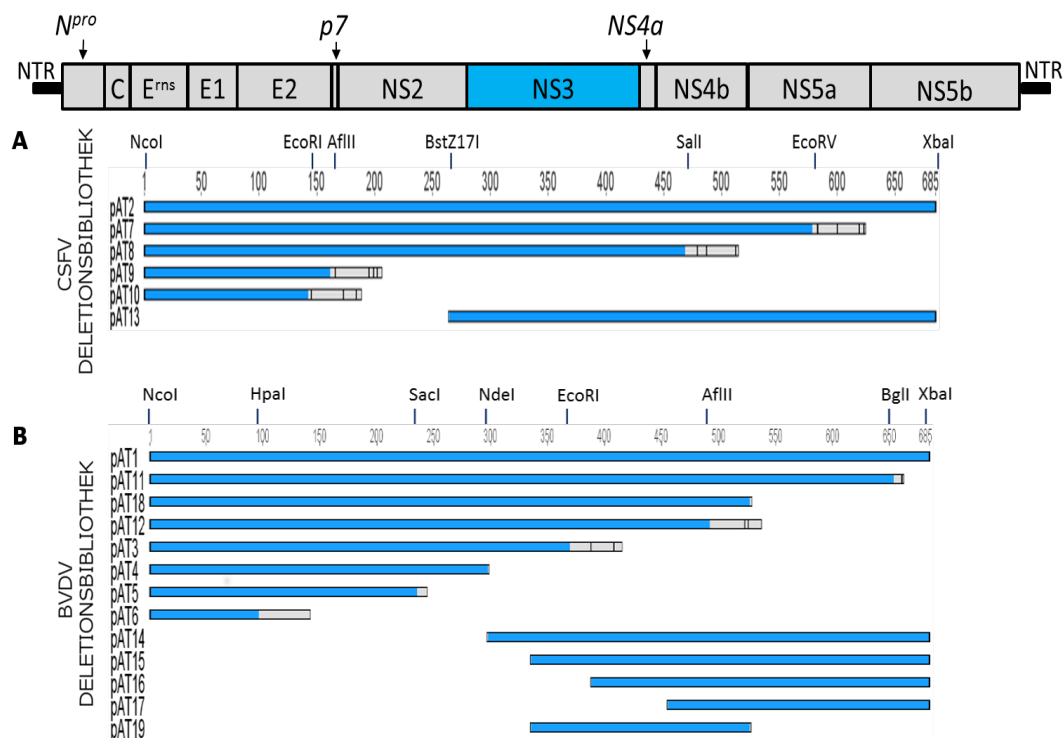


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Deletionsfragmente des CSFV Alfort/Tübingen NS3 und das BVDV CP7 NS3 mit den genutzten RE-Schnittstellen.

Plasmidbezeichnung sind vor den blauen Balken im unteren Teil angegeben. Diese blauen Balken entsprechen der im Plasmid für NS3 kodierenden Region. Die grauen Bereiche symbolisieren fremde, nicht zu NS3 gehörige AS, die infolge eines erst weiter stromabwärts folgenden Stopp Codon am NS3 Fragment anhängen. (A) CSFV Alfort/Tübingen Deletionsfragmente. (B) BVDV CP7 Deletionsbibliothek. pAT15-19 wurden mittels speziellen PCR Primern mit enthaltenen zusätzlichen RE-Schnittstellen erstellt.

Um hochauflösende Immunfluoreszenzbilder aufzunehmen, wurden BHK-21 Zellen auf Deckgläsern ausgesät, die Proteine transient exprimiert, mit PFA fixiert und die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Nach Inkubation mit Code4 sowie mit Fluorophor markierten Sekundärantikörpern wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern fixiert. Für die Zellkernfärbung wurde dem Eindeckelmedium zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zugesetzt. Die im Folgenden dargestellten Aufnahmen wurden am Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome Modul erstellt.

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen der CSFV Alfort/Tübingen-Deletionsbibliothek ergaben ein negatives Ergebnis für pAT8-pAT10. Nur die erste c-terminale Deletion pAT7 sowie die n-terminale Deletion in pAT13 ergaben ein positives Signal mit Code4 (Abbildung 19).

Für die CP7-Deletionsbibliothek ergaben die Aufnahmen eine ähnliche Eingrenzung. Die c-terminale Deletion in pAT12 führte bereits zu fraglicher Detektion durch Code4, alle weiteren c-terminalen Deletionen in pAT3-6 waren eindeutig negativ. Von der n-terminalen Seite verkürzte Proteine, die von pAT14 und pAT15 exprimiert wurden, erwiesen sich als positiv bezüglich der Code4 Bindung, während die weiteren Deletionen in pAT16 und pAT17 zu einem negativen Ergebnis führten. pAT19, welches für das von beiden Seiten verkürzte NS3-Fragment kodiert, führte nach transienter Expression zu einem eindeutigen Fluoreszenzsignal mit Code4 (Abbildung 19).

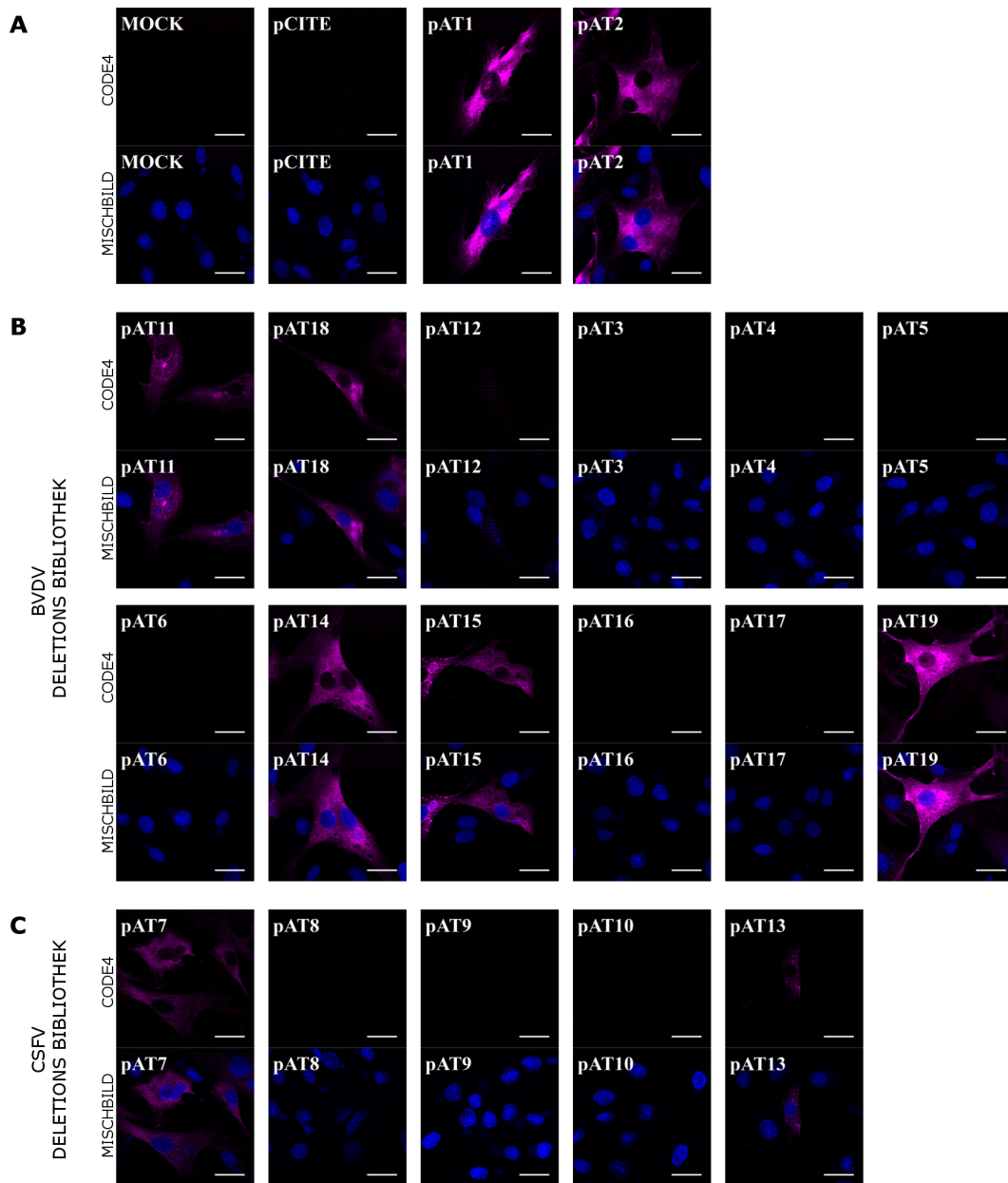


Abbildung 19: Immunfluoreszenz nach Expression der verkürzten NS3 Proteine der beiden Deletionsbibliotheken.

Die Plasmide wurden in BHK-21 Zellen transfiziert, die zuvor mit MVA T7 infiziert wurden. Diese exprimierten Proteine wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 gefärbt. Die oberen Reihen zeigen die Färbung mit Code4. Zellkerne wurden für die Mischbilder mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m. (A) Zur Kontrolle wurden Mock behandelte Zellen, sowie der leere Vektor pCITE2a ohne Insert und die Ausgangsplasmide pAT1 (BVDV CP7 NS3) und pAT2 (CSFV Alfort/Tübingen NS3) transfiziert. (B) BVDV Deletionsbibliothek (siehe Abbildung 18B) pAT19 zeigt das von beiden Enden verkürzte NS3. (C) CSFV Deletionsbibliothek (siehe Abbildung 18A).

2.1.2. Zwanzig Aminosäuredeletionen – Analyse interner Deletionen im verkürzten CP7 NS3

Um die Lokalisation des Epitopes besser kartieren zu können, wurde für die weiteren Schritte pAT19 verwendet. pAT19 enthält das für 193AS kodierende CP7-NS3 Fragment, das mittels der Deletionsanalyse als die kürzeste das Epitop enthaltende Region eingegrenzt worden war. Dieses Fragment enthält die Helikasedomäne, welche essentiell für das Virus ist.

Um den Bereich der für die Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren zu identifizieren, wurden Deletionsmutanten von pAT19 abgeleitet, welche im verkürzten NS3-Fragment schrittweise für Deletionen von 20AS kodieren. Im letzten Konstrukt, pAT29, umfasst die Deletion den kodierenden Bereich der carboxyterminalen 13AS (Abbildung 20).

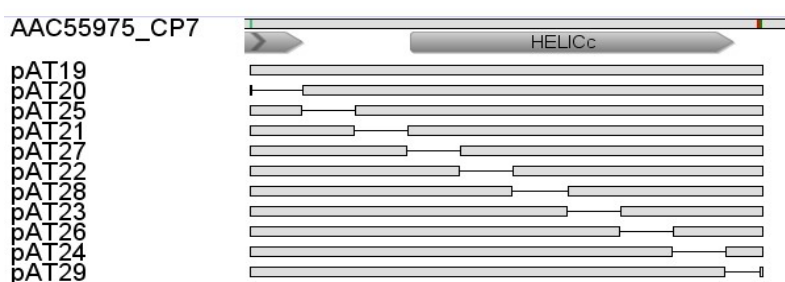


Abbildung 20: Schema der zwanzig AS-Deletionsschritte im verkürzten CP7 NS3-Fragment.

Bezeichnung des Plasmides mit der jeweiligen Deletion ist links angegeben. Als Referenz dient GenBank Zugriffsschlüssel AAC55975. Der graue Pfeil gibt die Lokalisation der funktionellen Domäne HELICc der Helikase an.

Diese Deletionen wurden via Fusions-PCR (III.2.4.1.1.2) aus pAT19 abgeleitet. Dafür wurden zwei PCR-Fragmente aus pAT19 mit jeweils komplementären Überhängen am 3' Ende des „sense“ Fragmentes bzw. 5' Ende des „antisense“ Anteils per PCR generiert. Die Fusion der beiden Fragmente erfolgte mittels einer zweiten, zweischrittigen PCR, in der zuerst die beiden überhängenden Einzelstrangbereiche hybridisieren. Im zweiten Schritt erfolgte die Amplifikation des fusionierten Fragments mit dem Primerpaar pCITE und pCITErev. Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde mittels NcoI und SphI in pCITE2a eingefügt.

Nach Überprüfung der Sequenz wurden die NS3-Fragmente analog zu den zuvor durchgeführten Versuchen in BHK-21 Zellen exprimiert und mittels Immunfluoreszenz auf Bindung von Code4 überprüft.

Die Kontrolle pAT19 sowie pAT20($\Delta 1$), pAT26($\Delta 8$) und pAT24($\Delta 9$) zeigten ein eindeutig positives Fluoreszenzresultat (Abbildung 21). Ein schwaches Signal bzw. keine eindeutigen Ergebnisse zeigten die NS3-Fragmente pAT29($\Delta 10$) und pAT23($\Delta 7$). Eindeutig negativ zeigten sich die Fragmente mit den Deletionen $\Delta 2$ - $\Delta 6$, in den Plasmiden pAT21, 27, 22 und 28.

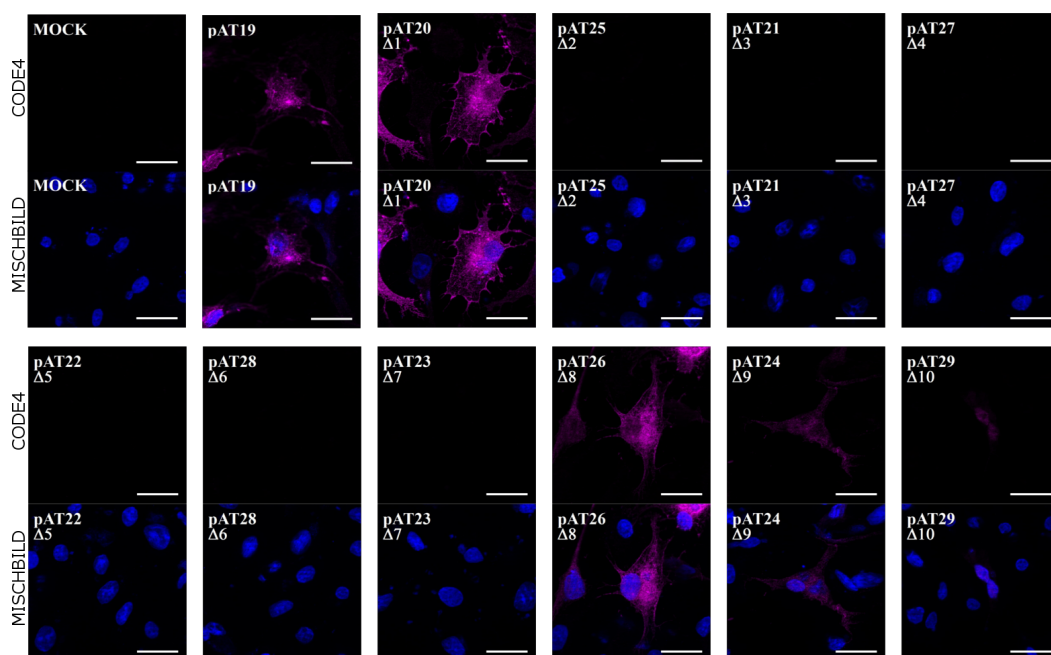


Abbildung 21: Immunfluoreszenzresultate nach Expression der pAT19 Varianten.

Die angegebenen Plasmide (siehe Abbildung 20) wurden mittels MVA T7 Virus in BHK-21 Zellen exprimiert. Die so exprimierten Proteine wurden mit Code4 und Alexa Fluor® 488- α mouse inkubiert. Die jeweils obere Reihe zeigt das Ergebnis der Interaktion der Proteine mit dem mAK Code4. In der jeweiligen unteren Reihe wurden für das Mischbild die Zellkerne mit DAPI angefärbt (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

Parallel wurden die Deletionen im verkürzten NS3-Fragment im Western Blot (WB) analysiert. Für diese zweite Immunodetektion der Proteine mittels Code4 wurden die Plasmide wieder in BHK-21 Zellen mit Hilfe des Vacciniavirus MVA T7 transient exprimiert. Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Nach Prozessierung der Proben im SDS-Gel

wurden die Proteine auf eine Membran geblottet und mittels mAK oder Serum nachgewiesen. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben der Detektion aufgrund unzureichender Proteinsynthese oder Instabilität des mutierten Proteins erfolgte, wurden die Proteinfragmente mit dem gegen NS3 gerichteten Polyklonalserum A03 überprüft.

Für den Nachweis der verkürzten NS3 Proteine im Western Blot mit Code4 ist zusammenzufassen, dass sich das Ergebnis mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz hinsichtlich der Detektionslücke von pAT25 Δ 2 zu pAT28 Δ 6 deckte. Im Unterschied ist allerdings zu vermerken, dass sich die dem eindeutig erkannten Fragment pAT26 Δ 8 anschließenden Deletionen im Western Blot als negativ für die Detektion mit Code4 erwiesen (Abbildung 22). Zwei Fragmente, pAT28 Δ 6 sowie pAT23 Δ 7, konnten in der Kontrolle mit dem Polyklonalserum nicht eindeutig sichtbar gemacht werden. Bei längerer Belichtung war für das von pAT28 Δ 6 kodierte Protein eine sehr schwache Bande zu detektieren, die Bande für das zweite Fragment aus pAT23 Δ 7 war aber auch in Wiederholungsversuchen nicht nachweisbar, trotz intaktem Plasmid (Blots nicht gezeigt).

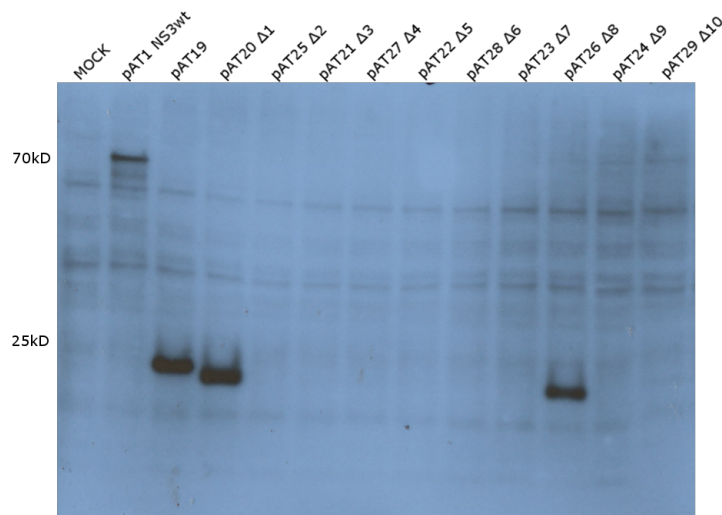


Abbildung 22: Detektion der exprimierten, verkürzten NS3 Proteine im Western Blot.

Die pAT19 Varianten wurden in BHK-21 Zellen transient exprimiert. Nach Prozessierung im SDS Gel und Blot auf PVDF-Membran wurden die Proteine mittels Code4 nachgewiesen. Der Western Blot wurde zuvor in 5% Milchpulver geblockt. Zur Kontrolle wurden Mock behandelten Zellen analysiert und zudem Zellen, in denen das vollständige NS3 aus pAT1 exprimiert wurde.

2.1.3. Zwanzig Aminosäure Deletionen im Kontext des gesamten NS3

Die über die obige Deletionsanalyse gewonnen Ergebnisse ließen die Frage offen, ob sie z.T. fehlerhaft waren, da die Analyse auf einem stark verkürztem NS3-Protein beruhte, die Reaktion mit dem carboxyterminalen Bereich unerklärlich schwach war und der interne Bereich, in dem Deletionen zu negativem Ergebnis führten, mit 100AS sehr groß war. Diese Überlegungen lassen die Frage aufkommen, ob Teile der Ergebnisse mit der starken Verkürzung des Basiskonstrukts pAT19 zusammen hängen. Das Protein könnte auf Grund der Verkürzung und dem damit fehlenden natürlichen Kontext fehlgefaltet sein. Um dies zu überprüfen, wurden die in das verkürzte NS3 eingeführten internen zwanzig AS Deletionen analog in das Gesamt-NS3 eingeführt. Die Vorgehensweise entsprach den auf pAT19 basierenden Konstrukten. Mittels Fusions-PCR und den gleichen internen Primern wurden neue Plasmide basierend auf pAT1 generiert ($\Delta 2$ - $\Delta 9$). Für Deletionen $\Delta 1$ sowie die auf zwanzig AS verlängerte carboxyterminale Deletion $\Delta 11$ wurden neue Primer entworfen und die entsprechenden kodierenden Bereiche via Fusions-PCR deletiert (Abbildung 23).

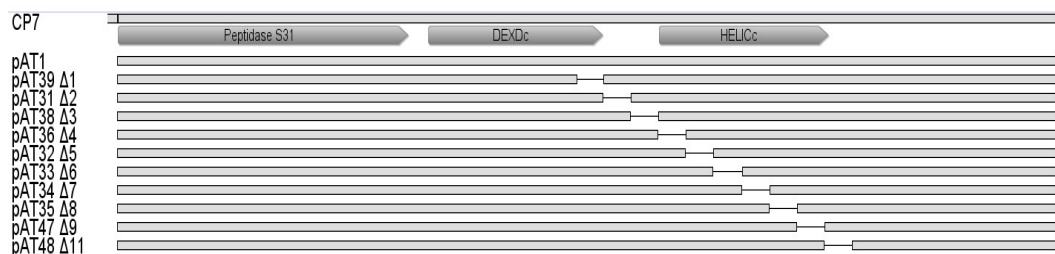
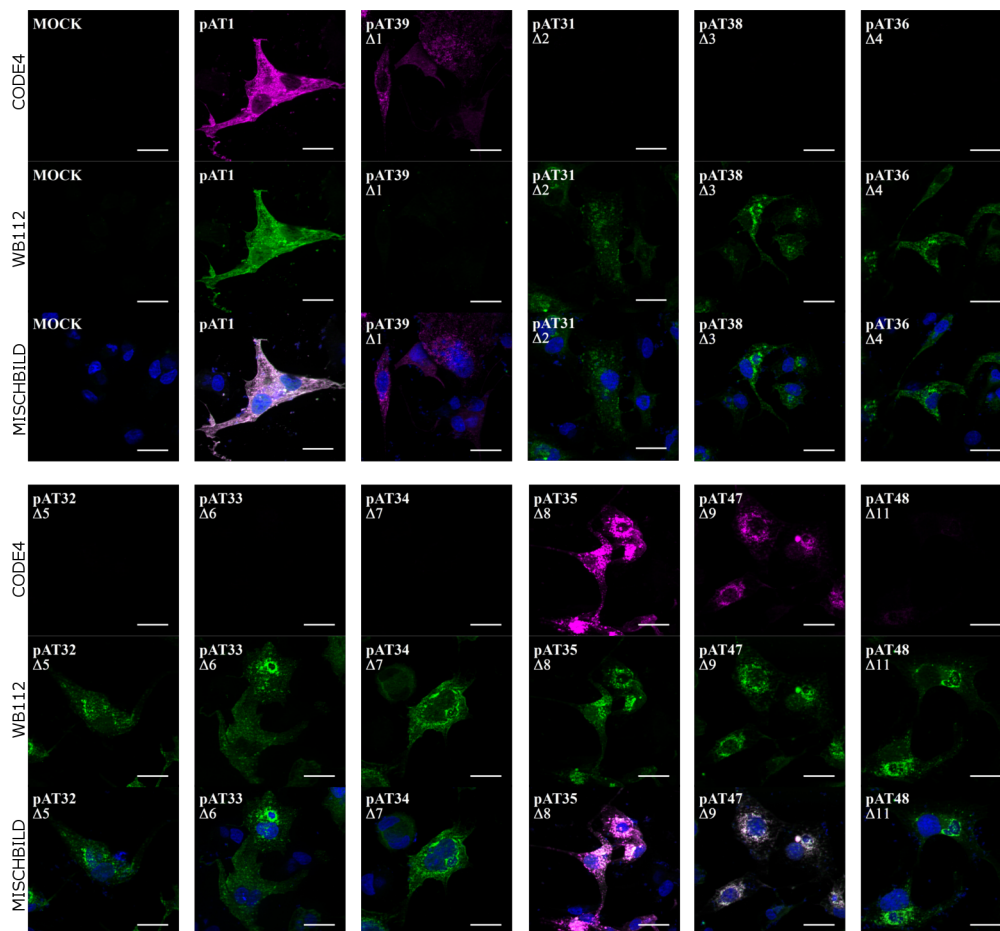


Abbildung 23: Schematische Darstellung der eingeführten 20AS Deletionen im vollständigen NS3.

Bezeichnungen der Plasmide, welche für das jeweilige Fragment kodieren sind links angegeben. Als Referenz des CP7 Proteins dient GenBank Zugriffsschlüssel AAC55975. Die grauen Pfeile unterhalb der Referenz geben die Lokalisation der funktionellen Domäne des Proteins an.

Die Plasmide wurden wie schon zuvor sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western Blot getestet. Um sicher zu gehen, dass NS3 in den Zellen vorhanden war und negative Ergebnisse nicht auf mangelnde Expression oder Stabilität



127

Die Plasmide (siehe Abbildung 23) wurden mittels MVA T7 in BHK-21 Zellen transient exprimiert. Diese Proteine wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 sowie zur Kontrolle mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a detektiert. Die obersten Reihen zeigen jeweils die Färbung mit Code4/ IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis von NS3 mit WB112/ Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). In den unteren Reihen wurden die Mischbilder abgebildet, bei der die Bilder beider Fluoreszenzkanäle überlagert wurden sowie die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

Im Western Blot bestätigte sich, dass die Proteine mit den Deletionen Δ 2- Δ 7 nicht mit Code4 detektierbar waren, während die folgenden Deletionen, Δ 8- Δ 11, in diesem Assay mittels Code4 nachgewiesen werden konnten. Die erfolgreiche Expression aller Proteine wurde mit WB112 nachgewiesen (Abbildung 25).

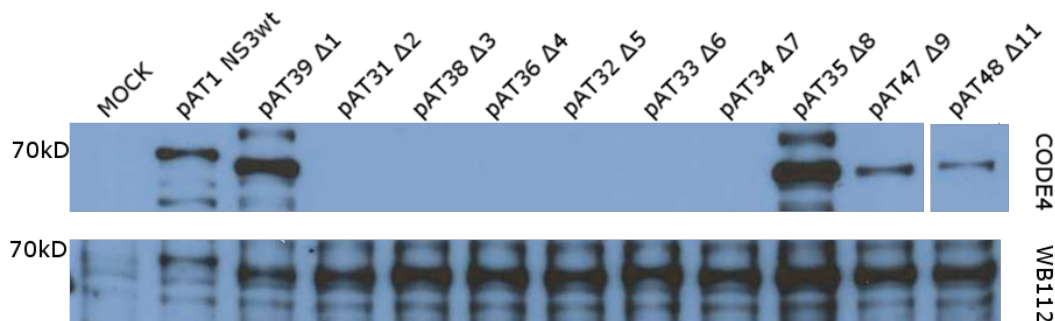


Abbildung 25: Detektion der exprimierten NS3 Varianten mittels Code4 und WB112 im Western Blot.

Die Plasmide, welche für die schrittweisen Deletionen kodieren, wurden in BHK-21 Zellen mit Hilfe des Vacciniavirus MVA T7 exprimiert. Nach Auftrennung der Proteine in zwei SDS Gelen wurden die Proteine auf NC-Membranen transferiert. Beide Membranen wurden in 5% Milchpulver geblockt. Anschließend wurde eine Membran mit Code4, die zweite Membran mit WB112 inkubiert. Der obere Abschnitt zeigt die mit Code4 zu detektierenden Proteine. Im unteren Abschnitt alle exprimierten Proteine im Nachweis mit WB112.

Fasst man die Resultate zusammen, ergibt sich, dass eine Region von 120AS das Epitop für Code4 enthält. Dieser Bereich enthält auch fast die gesamte HELICc Domäne des Proteins.

2.1.4. Alaninscan der Deletionsregionen $\Delta 2$ - $\Delta 3$ mittels Pentamersubstitutionen

Um die essentiellen AS des Code4-Epitopes einzugrenzen, wurden die nächsten Schritte basierend auf vorhergesagten Strukturdaten sowie unter Berücksichtigung der funktionellen Domänen des Proteins geplant. Beides wurde mit Hilfe der Genius® Software analysiert. Deletionsregionen $\Delta 2$ und $\Delta 3$ scheinen die einzigen Bereiche zu sein, welche die funktionellen Domänen der Helikase, DEXDc und HELICc nicht tangieren. Betrachtet man in dieser Analyse die vorhergesagten Sekundärstrukturen, so spricht auch hier einiges dafür, dass sich die Binderegion des mAks in diesem Bereich befindet. Die Annahme, dass es zu ausgeprägten Fehlfaltungen des Proteins durch die eingeführten Deletionen $\Delta 4$ - $\Delta 7$ kommt, scheint nach dieser Analyse wahrscheinlich. Somit könnte die ausbleibende Detektion der Proteine in diesem Bereich auf die mangelnde Präsentation der Epitopregion zurück zu führen sein, im Gegensatz zu den deutlich weniger die Faltung beeinflussenden Deletionen $\Delta 2$ und $\Delta 3$. Ein weiterer Aspekt bei der Entscheidung für die nächsten Schritte war, dass der Bereich zwischen den beiden funktionellen Domänen, die größte Chance bot, dass die Veränderungen vom Virus toleriert werden könnten, ohne die für Virus Replikation essentiellen Bereiche zu zerstören.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden Regionen $\Delta 2$ und $\Delta 3$ für das Feinmapping mittels Alaninscan durch aufeinanderfolgende Alanin-pentamersubstitutionen ausgewählt.

Expressionskonstrukte, abgeleitet von pAT1, welche für Alanin-substitutionsmutanten kodieren wurden mittels Quik Change®-PCR (QC-PCR) etabliert (III.2.4.1.1.3). Diese Form der zielgerichteten Mutagenese führt die angestrebten Veränderungen direkt via PCR im Plasmid ein. Die gewünschte Basensubstitution ist in beiden Oligonukleotiden, in Plus- und Minusstrangorientierung, enthalten. Anschließend wurden die generierten Plasmide sequenziert und mittels IF und WB auf Interaktion mit Code4 untersucht.



Abbildung 26: Schematische Darstellung der eingeführten Veränderung in pAT1 für den Alaninscan.

(A) Schematische Übersicht über die eingefügten Alaninsubstitutionen (in schwarz dargestellt). Die grauen und grünen Pfeile unterhalb des Referenzproteins (GenBank Zugriffsschlüssel AAC55975) stellen die funktionellen Domänen und Bindungsstellen dar. Der eingerahmte Bereich ist im Detail in B dargestellt. (B) Darstellung der Veränderungen auf Basis der kodierten Aminosäuren im einzelnen Plasmid.

Die Immunfluoreszenzergebnisse in der Färbung mit Code4 ergaben ein negatives Ergebnis für Alaninsubstitutionen #7, 8, 11. Für Substitution #10 war ein ganz schwaches Signal für Code4 zu detektieren. Die Analyse mit dem Kontrollantikörper WB112 ergab für alle Plasmide ein positives Signal, wenn dieses auch für Substitution 11 deutlich verringert war (Abbildung 27).

Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse (Abbildung 28). Auch hier konnten die Proteine, welche die Alaninsubstitutionen #7, 8 sowie 10 und 11 enthalten, nicht mit Code4 detektiert werden, obwohl die Proteine auf der Membran durch das polyklonale α NS3 Serum A03 nachgewiesen wurden. Somit scheinen sich die das Epitop charakterisierenden AS in diesen Bereichen zu befinden.

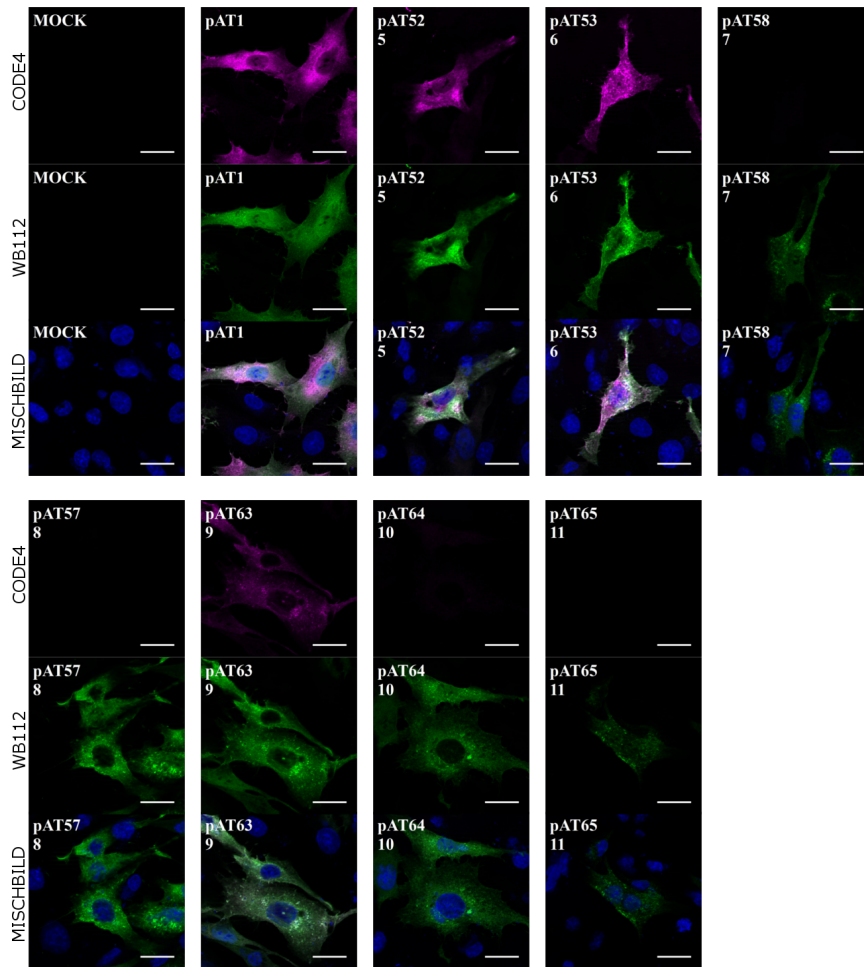


Abbildung 27: Immunfluoreszenzanalyse des Alaninscans mittels Pentamersubstitutionen.

Die Plasmide, die für die Proteine mit Alaninpentamersubstitutionen kodieren (siehe Abbildung 26), wurden mittels Lipofectamine 2000 in zuvor mit MVA T7 infizierten BHK-21 Zellen transfiziert. Die exprimierten Proteine wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 sowie zur Kontrolle mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a detektiert. Die obersten Reihen zeigen jeweils die Färbung mit Code4/IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis der NS3 Proteine in der Zelle mit WB112/Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). In den unteren Reihen wurden die Mischbilder abgebildet, welche die Signale beider Fluoreszenzkanäle überlagert enthalten, sowie die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

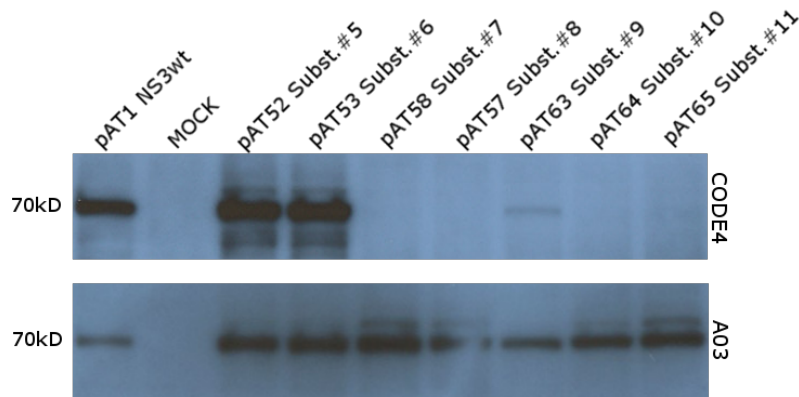


Abbildung 28: Detektion der für den Alaninscan exprimierten NS3 Varianten mittels Code4 und polyklonalem Serum im Western Blot.

Die Plasmide wurden in BHK-21 Zellen mit Hilfe des Vacciniavirus MVA T7 exprimiert. Nach Prozessierung der SDS Gele wurden die Proteine auf PVDF Membran transferiert. Vor Inkubation mit Code4 wurde die Membran in 5% Milchpulver geblockt. Nach Exposition des Röntgenfilms wurde die Membran mit Strip-Puffer behandelt und der gebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde erneut in 5% Milchpulver inkubiert und die Proteine im Anschluss mit dem polyklonalen α NS3 Serum A03 auf derselben Membran detektiert. Der obere Abschnitt zeigt die mit Code4 zu detektierenden Proteine. Im unteren Abschnitt ist der Nachweis aller erfolgreich exprimierten NS3 Proteine von den einzelnen Plasmiden dargestellt.

Auffällig ist die eindeutige Detektion der Alaninsubstitutionsmutante #9 (pAT63) in der IF sowie im Western Blot im Kontrast zu den eindeutig negativen Ergebnissen für die flankierenden Substitutionsvarianten #8 und #10 (pAT57 und pAT64). Um die Rolle dieser fünf AS in Bezug auf einen möglichen konformationellen Kontext zu verifizieren, wurde ein Expressionsplasmid mittels Fusions-PCR generiert, welches für eine interne Deletion dieser fünf AS im NS3 kodiert. Die Immunfluoreszenzergebnisse weisen auf ein konformationelles Epitop hin. Das im Deletionskonstrukt pAT116 kodierte Protein bleibt im IF-Nachweis negativ, obwohl die Bindesequenzen der flankierenden Regionen #8 und #9 unverändert waren (Abbildung 29).

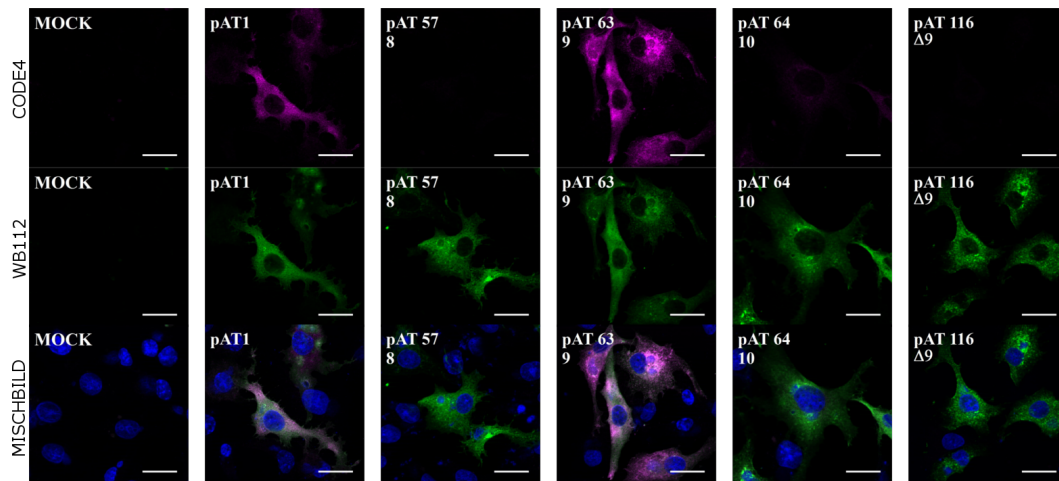


Abbildung 29: Alaninsubstitutionsbereich #9 in der Fluoreszenz.

Die angegebenen Plasmide wurden mittels Vacciniavirus MVA T7 in BHK-21 Zellen transient exprimiert. Diese Proteine wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 sowie zur Kontrolle mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a detektiert. Um den unterschied der Detektion von Alaninsubstitution #9 zu den umliegenden Bereichen zu verdeutlichen, wurden die flankierenden Alaninsubstitutionen #8 und #10 zusätzlich exprimiert. Das Ergebnis der Deletionsvariante ist ganz rechts abgebildet. pAT1 wurde als Kontrolle transfiziert. Die obere Reihe stellt die Färbung mit Code4/ IgG1- α mouse-Cy3 (magenta) dar. Der Nachweis der NS3 Proteine in der Zelle mit WB112/ Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün) ist in der mittleren Reihe abgebildet. Die Mischbilder befinden sich in der unteren Reihe. Diese Bilder enthalten die Signale beider Fluoreszenzkanäle überlagernd, sowie die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

2.1.5. Feinmapping des eingegrenzten Bereichs mittels Doppelalaninscan

Um die für die Erkennung durch Code4 verantwortlichen AS genauer definieren zu können, wurden weitere von pAT1 abgeleitete Expressionsplasmide durch QC-PCR hergestellt. Diese neu generierten Alaninsubstitutionsmutanten, in denen jeweils zwei AS durch Alanin ausgetauscht wurden, sollten eine weitere Eingrenzung der Bindungssequenz im Bereich der zuvor getesteten Substitutionsvarianten #7-11 ermöglichen (Abbildung 30).

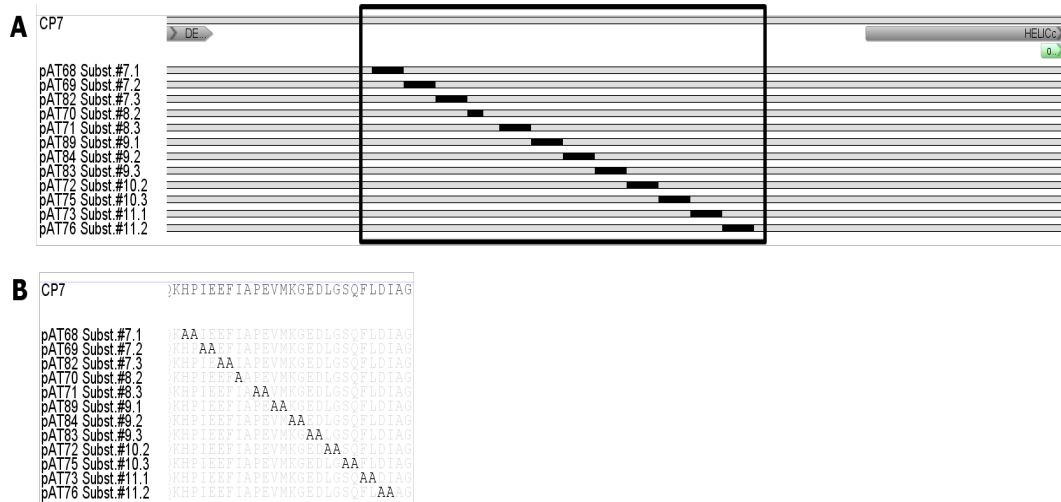


Abbildung 30: Schematische Darstellung der eingeführten Veränderungen in pAT1 für das Feinmapping.

(A) Schematische Übersicht über die eingefügten Alanindoppelsubstitutionen (in schwarz dargestellt). Die grauen Pfeile unterhalb des Referenzproteins stellen die funktionellen Domänen dar. Der eingerahmte Bereich ist im Detail in B dargestellt.

(B) Darstellung der Veränderungen auf Basis der kodierte Aminosäuren im einzelnen Plasmid.

Die Analyse der Immunfluoreszenzbilder der transient exprimierten Proteine der Alanindoppelsubstitutionsmutanten ergaben nur zwei Konstrukte, pAT71 8.3 PE und pAT72 10.2 LG, von denen ein NS3 exprimiert wird, welches mit Code4 kein bzw. ein kaum zu detektierbares Signal zeigte. Alaninsubstitutionen 7.1 und 7.2 schienen im NS3 die Bindung des AK zu beeinträchtigen, aber nicht komplett zu verhindern. Bei diesen Mutanten ist das Fluoreszenzsignal merklich reduziert gleiches gilt für Substitution 11.2. Im Gegensatz zu allen anderen Substitutionen ist bei dieser NS3-Variante auch das Signal des Kontrollantikörpers verringert, was die Einordnung des schwächeren Code4 Signals nicht eindeutig ermöglicht (Abbildung 31).

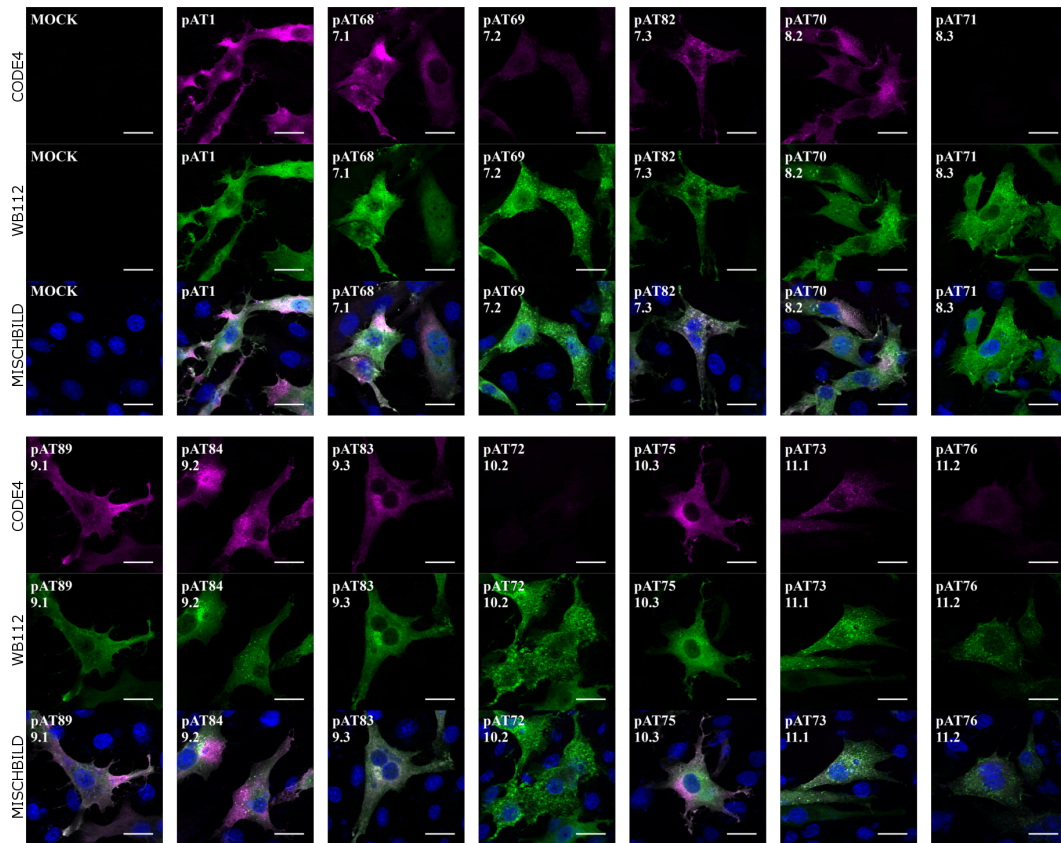


Abbildung 31: Immunfluoreszenzdetektion der Alanindoppelsubstitutionsmutanten.

In mit MVA T7 infizierten BHK-21 Zellen wurden die entsprechenden Plasmide (siehe Abbildung 30) mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Die exprimierten NS3 Proteinvarianten wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 sowie mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a zur Kontrolle detektiert. Die obersten Reihen zeigen jeweils die Interaktion der Proteine mit Code4/ IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis der NS3 Proteine mit WB112/ Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). Die Mischbilder, in denen die Signale beider Fluoreszenzkanäle überlagert dargestellt werden, sind in den unteren Reihen abgebildet. Die Färbung der Zellkerne wurde mit DAPI (blau) erreicht. Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

Für die Detektion der Proteine mit Doppelalaninsubstitution im Western Blot wurden die Proben nach erwarteter Signalstärke aufgetragen um längere Belichtungszeiten zu ermöglichen ohne Gefahr von Überbelichtung oder Detektion von Material durch akzidentiellen Transfer kleiner Probenmengen aus stark reagierenden Proben der Nachbarspuren (Abbildung 32). Die Auswertung der Immundetektion der Proteine im Western Blot deckt sich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz. Analog zur Fluoreszenzsignalstärke im ersten

Assay ergab sich eine Verringerung des Signals der alaninsubstituierten Proteine auf der Membran. Nur Proteine, welche Alaninsubstitutionen #8.3 sowie 10.2 und 11.1 enthielten, konnten auch nach langer Exposition des Films nicht detektiert werden. In der Kontrolle konnten alle exprimierten Proteine auf der Membran mit dem polyklonalen α NS3 Serum nachgewiesen werden.

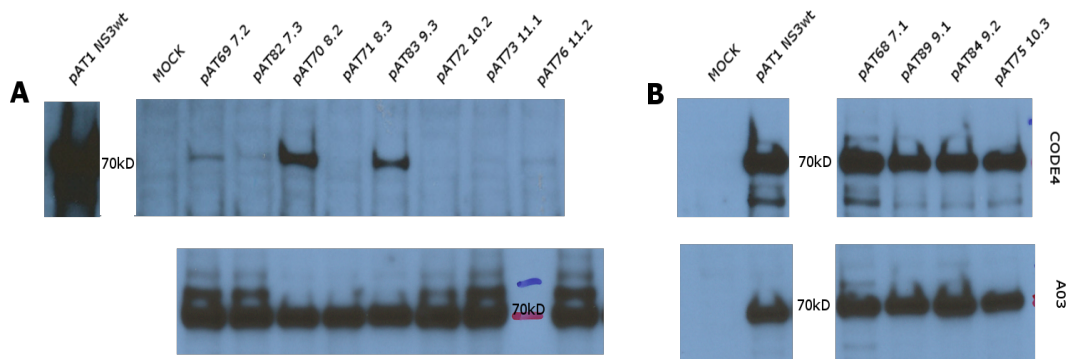


Abbildung 32: Detektion der exprimierten Proteine mit Alanindoppel-substitution.

Die Plasmide wurden in BHK-21 Zellen mit Hilfe von Vacciniavirus MVA T7 exprimiert. Nach parallel prozessierten SDS Gelen wurden die Proteine auf NC-Membranen transferiert. Nach dem Block in 5% Milchpulver wurden die Membranen mit Code4 oder α NS3 A03 inkubiert. Der obere Abschnitt zeigt die mit Code4 detektierten Proteine. Im unteren Abschnitt sind die exprimierten Proteine mit A03 nachgewiesen. (A) Proben mit erwarteter geringer Signalstärke für die Proteindetektion mit Code4 wurden in diesem Blot einer langen Exposition ausgesetzt. (B) Detektion der Proteine mit uneingeschränkter Bindung von Code4.

Die Substitution von PE₃₇₂₋₃₇₃AA führte in beiden Immunoassays zu einer Unterbindung der Interaktion von Code4 mit dem transient exprimierten CP7 NS3.

2.1.6. Etablierung des Markierungskonzeptes - Generierung einer Code4 negativen Virusmutante

Entsprechend publizierter Daten kann infektiöses BVDV CP7 nach in vitro Transkription und anschließender RNA Transfektion ausgehend von einem cDNA Konstrukt erhalten werden, wenn dieses die gesamten genetischen Informationen des Virus in Form von cDNA enthält. Um den Effekt der Alaninsubstitution PE₃₇₂₋₃₇₃AA im Virusgesamtkontext auf die Erkennung durch Code4 sowie die Lebensfähigkeit der Virusmutante zu untersuchen, wurde diese Veränderung in ein entsprechendes cDNA Plasmid (p798) eingebracht.

Dazu wurde in einem ersten Schritt ein NS3-Fragment aus dem Expressionsplasmid pAT71 mittels AflII und NdeI in einen CP7-Zwischenklon (pAT90) überführt. Im zweiten Schritt wurde aus dem so generierten Zwischenklon pAT91, das die Mutation enthaltende Fragment über die Restriktionsenzymchnittstellen NcoI und Sall in den mit denselben Restriktionsenzymen vorbereiteten CP7-cDNA-Gesamtklon p798 eingefügt. Der die Substitution #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA enthaltende Gesamtklon pAT92 wurde im nächsten Schritt mit SmaI linearisiert und in vitro transkribiert (III.2.4.1.6). Zur Kontrolle wurde das Ausgangskonstrukt p798 ebenfalls in vitro transkribiert. Mittels Elektroporation wurden die entstandenen RNA-Transkripte in MDBK-B2 Zellen eingebracht (III.2.4.1.8). Die Zellen wurden auf das Auftreten eines virusbedingten zytopathischen Effektes (CPE) beobachtet. Zur Überprüfung, ob lebensfähiges Virus entstanden war, wurden nach Auftreten eines deutlichen CPEs bei Wildtyp und Mutante, die Zellen durch Frieren/Tauen lysiert und zur Infektion neuer Zellen verwendet. Es wurden vier Passagen der beiden Virusvarianten in MDBK-B2 durchgeführt, um die Menge der neu generierten Viren zu steigern sowie die Mutante auf mögliche Reversionen oder anpassende Mutationen überprüfen zu können. Die vierte Passage wurde per Immunfluoreszenz und RT-PCR mit anschließender Sequenzierung auf das Markierungskonzept überprüft. Zur weiteren Charakterisierung wurden beide CP7-Varianten titriert und ihre Wachstumskinetik bestimmt.

Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Präparate wurden MDBK-B2 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit Passage 0 nach EP sowie der vierten Passage beider Viren infiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit PFA fixiert und im

Weiteren analog zu den Präparaten, die für den Nachweis des transient in BHK-21 exprimierten NS3 erstellt wurden, behandelt. Die Analyse der Präparate am Mikroskop ergab für die Alaninsubstitutionsmutante pAT92 keine Reaktion mit Code4, weder direkt nach EP noch nach der vierten Passage in MDBK-B2 (Abbildung 33). Die Doppelfärbung mit WB112 bestätigte die Infektion der Zellen mit pAT92. Mit Wildtypvirus-infizierte Zellen waren positiv in der Färbung mit beiden Antikörpern.

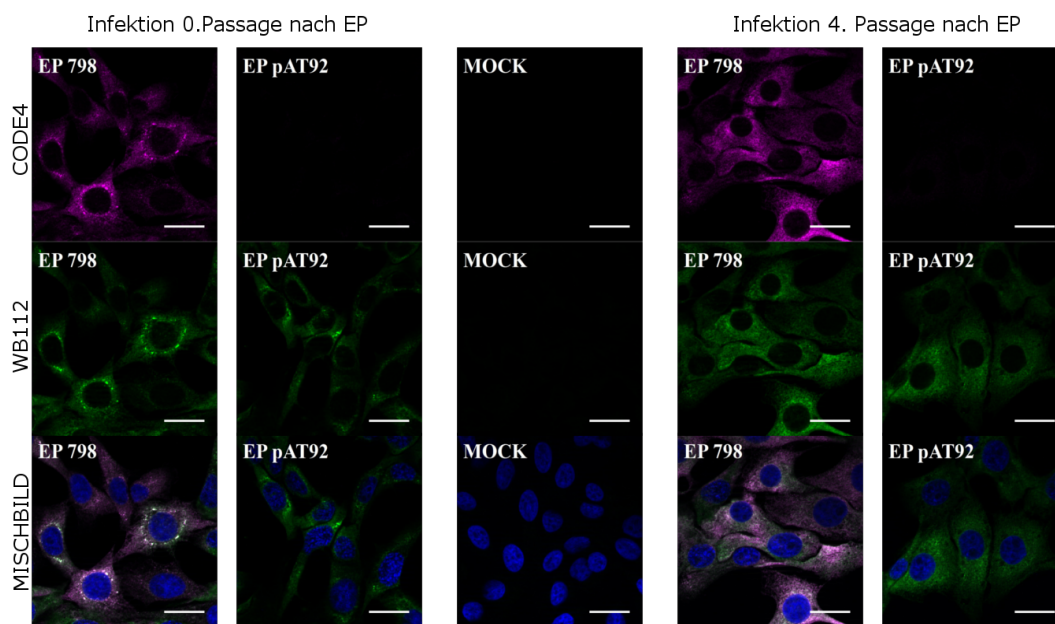


Abbildung 33: Nachweis der Generierung infektiöser Viren durch EP von RNA.

Infektion von MDBK-B2 Zellen mit durch Elektroporation (EP) von RNA in MDBK-B2 generierten infektiösen Viruspassagen. Die obere Reihe demonstriert das Markierungskonzept mit Code4, die mittlere Reihe den Nachweis der Infektion mittels NS3 Detektion durch WB112. Zusätzlich zur Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI (blau) wurden in der unteren Reihe die beiden Fluoreszenzsignale übereinander gelegt. Die linken Spalten wurden mit den Passagen des Ausgangsvirus 798 (CP7) und der generierten Markierungsmutante pAT92 direkt nach EP infiziert, die rechten Spalten mit den jeweils vierten Viruspassagen nach EP.

Zur Überprüfung der Sequenz wurden MDBK-B2 infiziert, aus diesen Zellen RNA extrahiert und das gesamte NS3 mittels RT-PCR amplifiziert (Primer: CP7-NS3 /CP7-NS3rev). Mittels Sequenzierung mit den Primern CP7-NS3, B25II, AT5 und CP7-NS3rev wurde das RT-PCR Produkt auf mögliche Veränderungen überprüft.

Die eingebrachte Mutation PE₃₇₂₋₃₇₃AA in pAT92 ist auch in der vierten Passage stabil. Es zeigte sich jedoch eine zusätzliche Mutation im flankierenden Bereich. Dabei handelt es sich um die Mutation des Codons K₄₂₁E.

Die Code4 negative Variante pAT92 zeigte in der vierten Passage im Vergleich zum Wildtypvirus nur geringfügig schlechtere Wachstumseigenschaften (Abbildung 34).

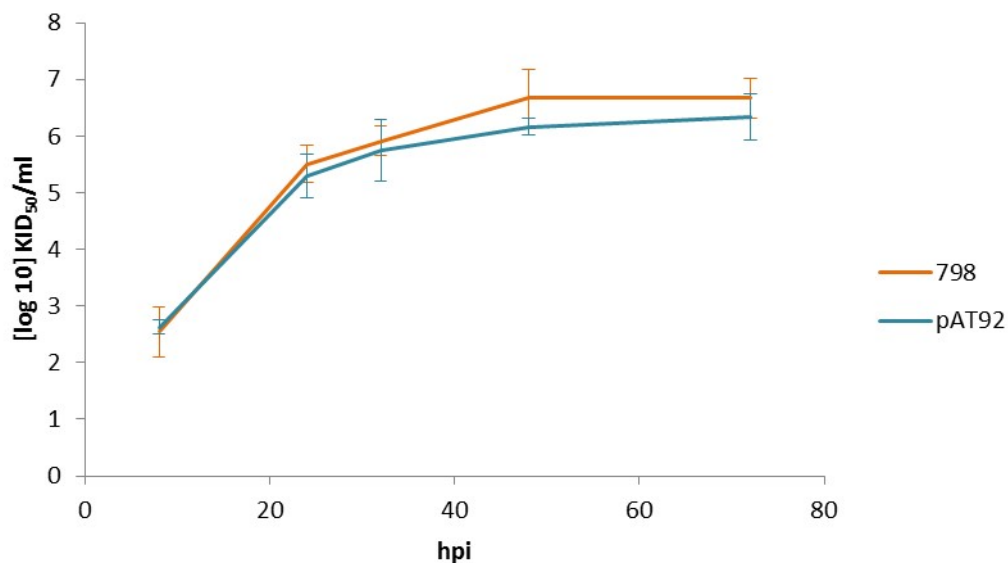


Abbildung 34: Wachstumskurve der Code4 negativen Virusvariante pAT92 im Vergleich zum Wildtypvirus 798 mit Standardabweichung.

2.1.7. Panpesti Ansatz – Einführung der Mutationen PE₃₇₂₋₃₇₃AA sowie LG₃₈₀₋₃₈₁AA in die NS3 Proteine eines weiteren BVDV-1, zweier BVDV-2 sowie in ein CSFV NS3

Code4 ist in der Lage, die NS3-Proteine aller bekannten Pestiviren zu erkennen. Im Abgleich verschiedener Pestivirussequenzen im durch vorangegangenen Analysen eingegrenzten Bereich zeigte sich NS3 auch in diesem hochkonserviert, mit nur wenigen Unterschieden zwischen den einzelnen Stämmen (Abbildung 35). Mittels der blauen Pfeile sind in der Abbildung die AS markiert, deren Substitution durch Alanin (PE₃₇₂₋₃₇₃AA und LG₃₈₀₋₃₈₁AA) den größten Einfluss auf die Bindung von Code4 an CP7-NS3 hatten. PE₃₇₂₋₃₇₃ und LG₃₈₀₋₃₈₁ sind in allen

überprüften Stämmen konserviert. Nur CSFV C-Stamm-Varianten, weisen eine Abweichung der Sequenz, E₃₇₃D, an dieser Stelle auf, werden aber dennoch von Code4 erkannt (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 35: Proteinsequenzvergleich verschiedener BVDV, CSFV, BDV sowie atypischer Pestiviren im in dieser Arbeit eingegrenzten Bereich.

Die blauen Pfeile unterhalb der BVDV CP7 Sequenz indizieren die Bereiche der Alanin Substitutionen #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA sowie #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA, graue Pfeile die funktionellen Domänen. Unterschiede zum BVDV CP7 NS3 sind farblich markiert. Gene Bank Referenznummern der einzelnen Stämme sind vor den Sequenzen angegeben. Oberhalb der Referenzsequenz ist durch das Sequenzlogo die Gewichtung der Sequenzunterschiede grafisch dargestellt.

Das Markierungskonzept durch die Alaninsubstitution #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA die Erkennung von NS3 durch Code4 auszuschalten, sollte aufgrund der konservierten Sequenz auf andere Vertreter der Pestiviren übertragbar sein. Für diesen Versuch wurden zusätzlich zum vorhandenen CSFV Alfort/Tübingen NS3 in pAT2, die NS3 kodierenden Sequenzen verschiedener BVDV in pCITE2a kloniert. Mittels PCR wurde das NS3-Gen von KE9 (BVDV Typ1, Klon#1678, Primer: CP7-NS3/CP7-NS3rev) und NY'93 (BVDV Typ2, Klon#pK40A, Primer: AT107/AT108r) amplifiziert. Über NcoI (NY'93 im Partialverdau) und XbaI wurden die PCR-Fragmente in pCITE2a integriert. Das Plasmid pB427, welches die codierende Sequenz für das BVDV 296 NS3 enthält, wurde von Dr. Birke Tews zur Verfügung gestellt. Von diesen Ausgangsplasmiden wurden mit QC-PCR Expressionskonstrukte abgeleitet, welche für die Mutation #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA oder #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA kodieren.

Analog zu den zuvor ausgeführten Experimenten, wurden auch diese Substitutionsmutanten mittels des Vacciniavirus MVA T7 transient exprimiert und wie oben beschrieben in beiden Assays getestet.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz weisen ein heterogenes Bild auf. Die Alanindoppelsubstitutionen im KE9 NS3 führen beide zu einer stark eingeschränkten Erkennung des Proteins mit Code4 und somit zu einem kaum detektierbaren Fluoreszenzsignal (Abbildung 36A). Der Einfluss der Alaninsubstitutionen in beiden BVDV Typ 2 Proteinen (NY'93 und 296) ist weniger ausgeprägt. In den Aufnahmen ist eine Reduktion des Fluoreszenzsignals für beide Substitutionsvarianten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp NS3 zu erkennen, wobei Substitution #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA einen etwas größeren Einfluss auf die Bindung zu haben scheint (Abbildung 36A untere Reihe & B). Die Blockierung der Reaktion, wie für CP7 gezeigt, konnte jedoch mit keiner der Mutanten erreicht werden. Zusätzlich zur BVDV NY'93 #8.3 Variante entstand ein weiterer Klon, pAT103, welcher zusätzlich zur Substitution PE₃₇₂₋₃₇₃AA für die Deletion des anschließenden Valin (V₃₇₄Δ) kodierte. Das von diesem Konstrukt exprimierte NS3 zeigte im Vergleich zum Protein, welches nur die Substitution #8.3 enthielt, eine deutliche Einschränkung in der Interaktion mit Code4 (Abbildung 36B). Die Auswertung der Immunfluoreszenz der beiden CSFV NS3 Alanindoppelmutanten ergab ein anderes Bild. Das NS3 mit der Substitution #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA reagierte mit Code4 und es war kaum ein Einfluss in der Signalintensität im Vergleich zum Wildtyp CSFV NS3 auszumachen. Substitution #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA hingegen beeinträchtigte die Bindung von Code4 am CSFV NS3 deutlich. So war in den Immunfluoreszenzuntersuchungen nur basal ein Signal zu detektieren (Abbildung 36C). Die komplette Verhinderung der Bindung von Code4 an das Protein wie oben für das CP7 NS3 gezeigt konnte aber mit keinem der etablierten Konstrukte erreicht werden.

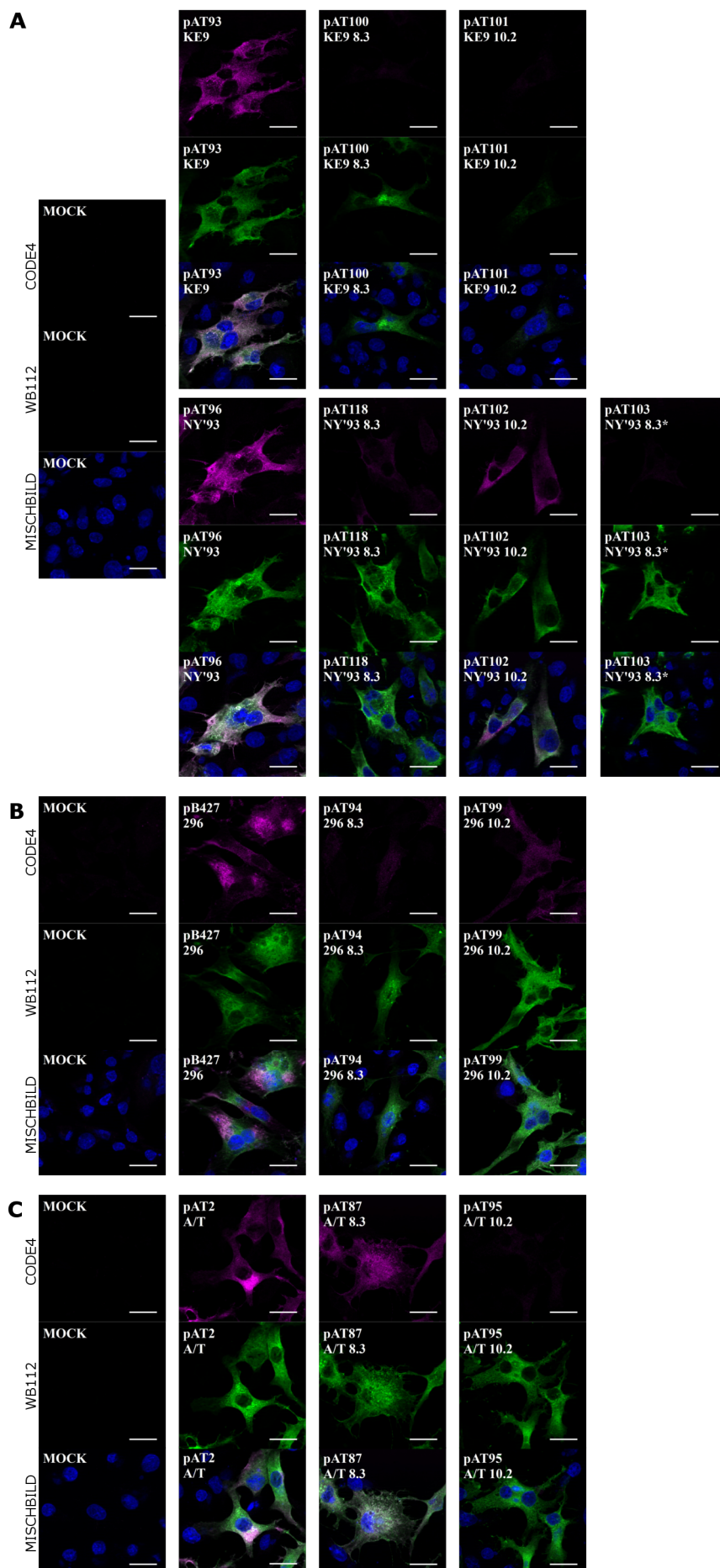


Abbildung 36: Immunfluoreszenzanalyse der Alanindoppelsubstitutionen in NS3 Proteinen verschiedener Pestiviren.

Die Proteine wurden transient in BHK-21 Zellen exprimiert. Diese Proteine wurden mit den Kombinationen aus Code4/IgG1- α mouse-Cy3 sowie WB112/Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a in den Präparationen detektiert. Die obersten Reihen zeigen jeweils die Färbung mit Code4/ IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis der NS3 Proteine mit WB112/ Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). In der jeweils unteren Reihe wurden die Mischbilder abgebildet. Diese zeigen die Überlagerung der Signale der beiden Fluoreszenzkanäle und die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Größenbalken entsprechen 20 μ m. (A) Transfektion der BVDV KE9 und BVDV NY'93 Varianten. (B) Immunfluoreszenzbilder der vom BVDV 296 NS3 abgeleiteten Proteine. (C) Detektion des CSFV NS3 Proteins und der zugehörigen Alanindoppelsubstitutionsmutanten.

Im Western Blot ergaben sich für fast alle Substitutionsmutanten negative Ergebnisse, wie das zuvor für die analogen CP7-Substitutionsmutanten beschrieben wurde. Einzig das von pAT87 (CSFV A/T #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA) kodierte Protein war, wenn auch sehr schwach, auf der Membran nachzuweisen (Abbildung 37B). Die Western Blots, mit denen das NY'93 NS3 und die zugehörigen Substitutionen überprüft wurden, sowie die CSFV Variante pAT95 #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA sind in der Abbildung nicht gezeigt.

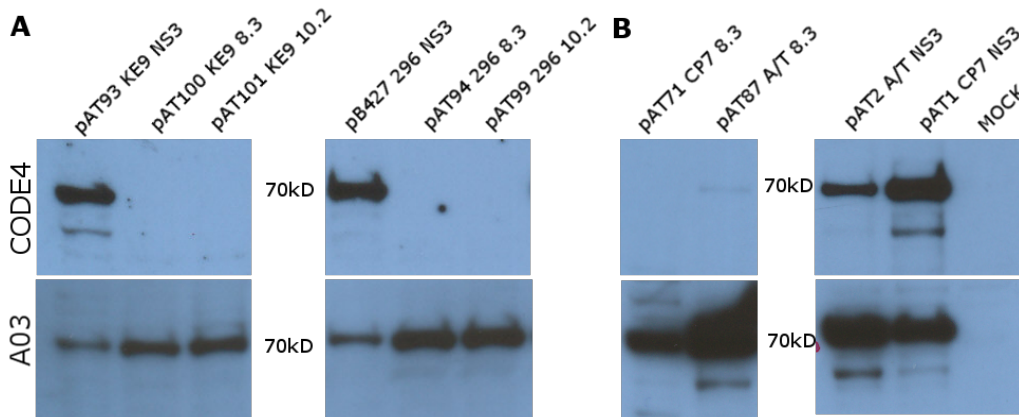


Abbildung 37: Detektion der Alanindoppelsubstitutionsmutanten im NS3 verschiedener Pestiviren im Western Blot.

Zur Immunodetektion wurden die Plasmide in mit MVA T7 infizierten BHK-21 Zellen transfiziert und die kodierten Proteine exprimiert. Nach Auftrennung der Proteine in SDS Gelen wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert. Die Membran wurde in 5% Milchpulver geblockt und im Anschluss mit Code4 inkubiert. Nach Exposition des Röntgenfilms wurde die Membran mit Strip-Puffer behandelt und der gebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde erneut geblockt und die Proteine im Anschluss mit dem polyklonalen α NS3 Serum A03 auf derselben Membran detektiert. Der obere Abschnitt zeigt die mit Code4 detektierten Proteine. Im unteren Abschnitt ist die Expression der NS3 Proteine von den einzelnen Plasmiden dargestellt nachgewiesen. (A) BVDV KE9 und BVDV 296 abgeleitete Proteine. (B) BVDV CP7 sowie CSFV Alfort/Tübingen NS3 Varianten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bindung von Code4 nicht nur von den beiden AS PE₃₇₂₋₃₇₃ abhängig ist, wie es durch die Ergebnisse für CP7 nahegelegt wurde. In allen generierten Mutanten scheinen die Substitutionen einen Einfluss auf die Bindung von Code4 an NS3 zu haben, aber sie führen nicht zur kompletten Ausschaltung der Reaktion. Es gibt für die NS3-Proteine aus den verschiedenen Stämmen eine abweichende Gewichtung der Auswirkung der Doppelalaninsubstitutionen. Für die BVDV NS3-Proteine hatte die Substitution #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA mehr Einfluss auf die Interaktion mit Code4. Im Unterschied hierzu scheint die Veränderung #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA im CSFV NS3 für die mAk Bindung störender zu sein als Mutation #8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA.

2.1.8. Pan Pesti Ansatz – Alaninpentamersubstitutionen im BVDV Typ 2 und CSFV NS3

Um die mit den Doppelalaninsubstitutionen gewonnenen Erkenntnisse besser einordnen zu können, wurden die Alaninpentamersubstitutionen #5 – 12, analog zu den im CP7 NS3 generierten Substitutionsmutanten (IV.2.1.4), auf das BVDV 296 NS3 sowie das CSFV NS3 übertragen. Mittels QC-Mutagenese wurden von pB427 (BVDV 296) sowie pAT2 (CSFV A/T) je sieben neue Plasmide abgeleitet, mit der Veränderung der entsprechenden codierenden Sequenzen.

Interessanterweise ergaben sich für beide NS3-Typen in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Detektion der Proteine durch Code4. In der Reihe der Alaninpentamersubstitutionen im BVDV 296 NS3 zeigte vor allem Substitution #8 kein Signal mit Code4, obwohl die Zellen mit dem Kontrollantikörper WB112 eindeutig positiv reagierten. Zusätzlich waren für exprimierte Proteine mit den Substitutionen #11 und 12 keine Fluoreszenzsignale mit Code4 zu sehen. Allerdings war in diesen Aufnahmen, neben dem fehlenden Signal mit Code4, ein deutlich reduziertes Signal des Kontrollantikörpers WB112 zu verzeichnen. Ähnlich den oben beschriebenen Ergebnissen für die Pentamersubstitutionen im CP7 NS3 war auch hier ein gut zu detektierendes Fluoreszenzsignal des Proteins mit der Substitution #9 mit Code4 zu beobachten. Dies gilt im BVDV 296 NS3 Kontext auch für Substitution #10 (Abbildung 38).

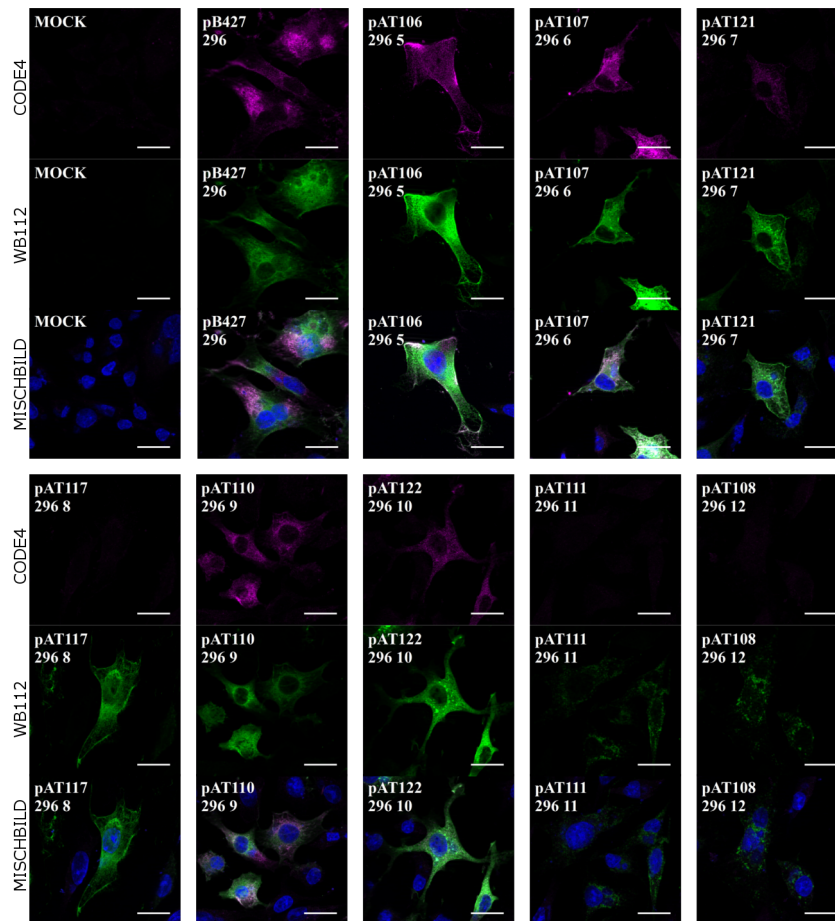


Abbildung 38: Immunfluoreszenzanalyse des Alaninscans mittels Pentamer-substitutionen im NS3 des BVDV 296.

Die Plasmide, die für die Proteine mit Alaninpentamersubstitutionen im BVDV 296 NS3 kodieren, wurden mittels Vacciniavirus MVA T7 in BHK-21 Zellen transient exprimiert. Die so erhaltenen Proteine wurden mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 sowie mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a detektiert. Die oberen Reihen zeigen jeweils die Färbung mit Code4/ IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis der NS3 Proteine in den Zellen mit WB112/ Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). Die Mischbilder der unteren Reihen bilden die Signale der Fluoreszenzkanäle überlagernd ab. Die Färbung der Zellkerne wurde mittels DAPI (blau) erreicht. Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

Für die Substitutionen im CSFV NS3 ergab sich in der Immunfluoreszenz ein Bild, das mit den Ergebnissen der Substitutionen im CP7 NS3 übereinstimmte. Alaninpentamersubstitutionen #5, 6 und 9 im CSFV NS3 zeigten ein eindeutiges Fluoreszenzsignal, Substitutionen #7 und 10 führen zu einem Fluoreszenzsignal an der Grenze zum Negativen. Für Proteine, die die Substitutionen #8, 11 und 12

enthalten, war definitiv kein Signal für eine Code4 Bindung zu detektieren. Hinsichtlich des Kontrollantikörpers konnte für Substitutionen #11 und 12 Vergleichbares beobachtet werden, wie schon für die analogen Substitutionen im CP7 (#11) und 296 (#11 und 12), nämlich eine deutliche Verringerung des Fluoreszenzsignals.

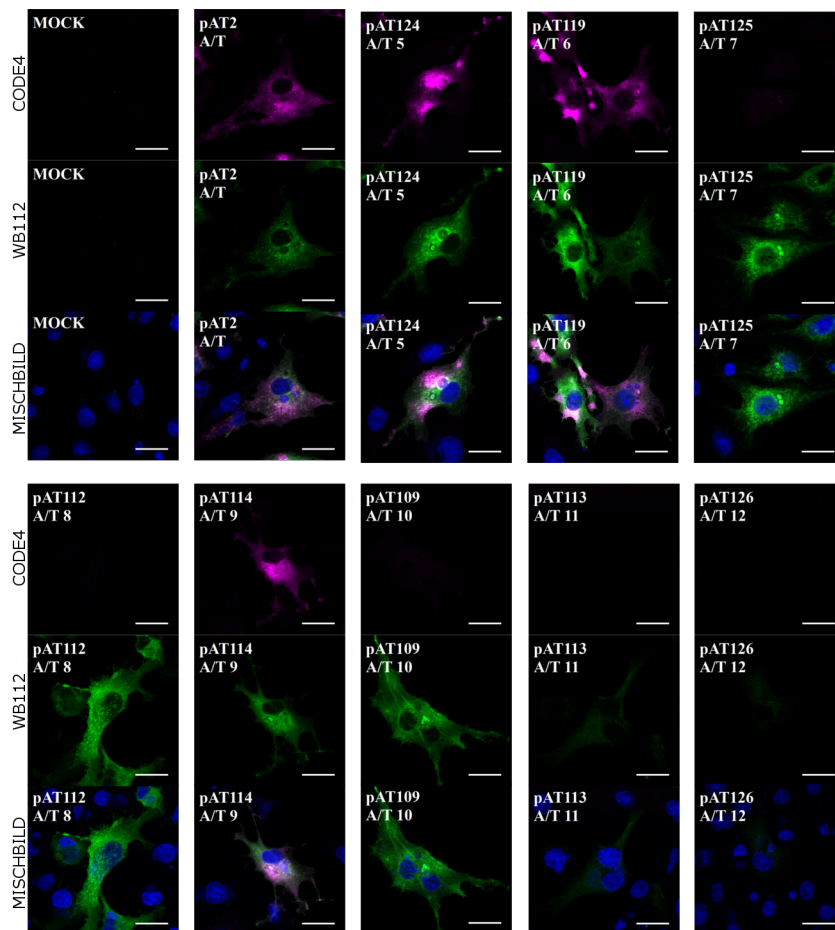


Abbildung 39: Immunfluoreszenz der Pentamersubstitutionsvarianten im NS3 des CSFV Alfort/Tübingen.

Die Proteine, die in Plasmiden abgeleitet von pAT2 für Alaninpentamersubstitutionen kodieren, wurden in BHK-21 Zellen transient exprimiert. Mit Code4/IgG1- α mouse-Cy3 sowie WB112/Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a wurden die Proteine detektiert. Die oberen Reihen zeigen jeweils die Färbung mit Code4 und IgG1- α mouse-Cy3 (magenta). Die mittleren Abschnitte enthalten den Nachweis der NS3 Proteine in den Zellen mit WB112 und Alexa Fluor® 488- α mouse-IgG2a (grün). Die Mischbilder der unteren Reihen bilden die Ergebnisse der Fluoreszenzkanäle inklusive der Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) überlagernd ab. Die Größenbalken entsprechen 20µm.

In der Analyse der Western Blots ergaben sich auch Unterschiede in der Auswirkung der Alaninsubstitutionen auf die Bindung von Code4 in den unterschiedlichen NS3-Typen. In diesem Fall waren die Ergebnisse der beiden BVDV-NS3-Bibliotheken deckungsgleich. Substitution #9 konnte auf der Membran mit Code4 detektiert werden, während keine Banden für die umliegenden Substitutionen #7- 8 und 10-12 zu erkennen waren. Alle exprimierten Proteine wurden mittels polyklonalem α NS3 Serum auf der Membran nachgewiesen (Abbildung 40A).

Die Alfort/Tübingen-NS3-Substitutionsmutanten #7-12 waren alle nicht auf der Membran auszumachen. Auch das Protein, welches Substitution #9 enthält, ist nicht mit Code4 zu detektieren (Abbildung 40B).

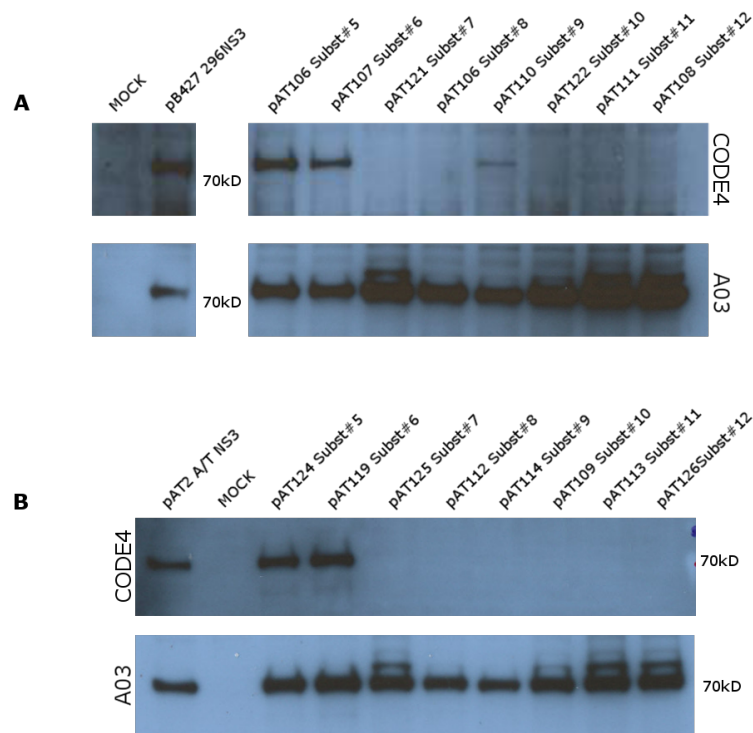


Abbildung 40: Alaninpentamersubstitutionsvarianten in der Immunodetektion mittels Western Blot.

Die von den Plasmiden kodierten Proteine wurden in BHK-21 Zellen mit Hilfe von Vacciniavirus MVA T7 exprimiert. Nach Prozessierung der SDS Gele wurden die Proteine auf PVDF Membran geblottet. Diese wurde in 5% Milchpulver geblockt und im Anschluss mit Code4 inkubiert. Nach Analyse des Ergebnisses mit Code4 wurde die Membran mit Strip-Puffer behandelt und der gebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde erneut geblockt und die Proteine im Anschluss mit dem polyklonalen α NS3 Serum

auf derselben Membran detektiert. Der obere Abschnitt zeigt jeweils die mit Code4 detektierten Proteine. Im unteren Abschnitt ist das Ergebnis nach Detektion mittels polyklonalem Serum dargestellt. (A) BVDV 296 NS3 Substitutionsmutanten. (B) CSFV Alfort/Tübingen NS3 Alaninpentamer-substitutionsvarianten.

Zusammenfassend konnte der Sequenzabschnitt $_{364}\text{HPIEEFIAPE}_{373}[\dots]_{380}\text{LGSQFLDIAGLKIP}_{393}$ als der Bereich des NS3 der Pestiviren eingegrenzt werden, der für die Bindung von Code4 entscheidend ist.

2.1.9. Strukturanalytische Daten basierend auf der Kristallstruktur der CSFV NS3 Helikase Domäne

Vor kurzem konnte die Kristallstruktur der CSFV NS3-Helikase aufgeklärt werden (TORTORICI et al., 2015). Anhand dieser Daten wurden die bislang in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse weiter analysiert. Das in der PDB Datenbank zu Verfügung stehende 3D Modell 4CBG wurde mit PyMOL bearbeitet (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99rc6 Schrödinger, LLC).

Im ersten Schritt wurden die einzelnen Abschnitte der 20 AS-Deletionen in der Struktur mit verschiedenen Farben markiert, um die Auswirkung der Deletionen im Bezug auf die Strukturveränderungen besser beurteilen zu können. (Abbildung 41A mit Farblegende im rechten Schema). Abbildung 41B fasst das Ergebnis der Analysen zusammen. In Cyan ist der Bereich markiert, der nach strukturanalytischen Überlegungen zum feineren Mapping ausgewählt wurde. Der Magenta eingefärbte Bereich umfasst die Deletionen $\Delta 4\text{-}\Delta 7$ im NS3, welche in den Immunodetektionen mit Code4 ebenfalls zu einem negativen Ergebnis geführt hatten. Es ist vorstellbar, dass die fraglichen Deletionen einen großen Effekt auf die Faltung der Helikase hatten und somit die durch diese Veränderungen induzierten negativen Ergebnisse erklärt.

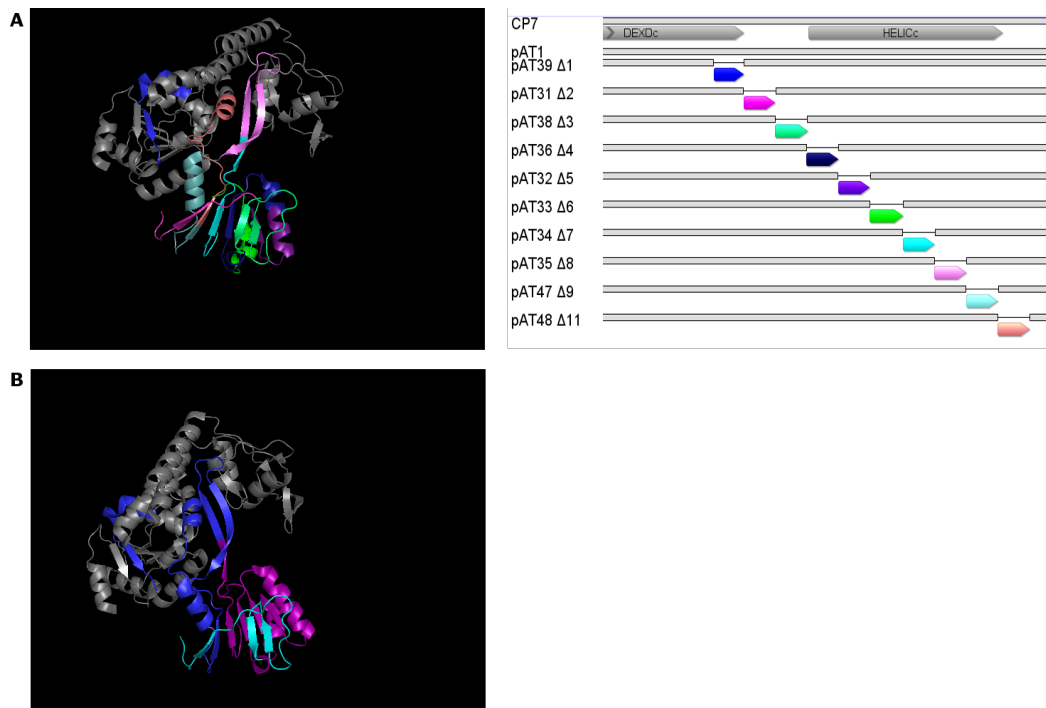


Abbildung 41: Darstellung der Lokalisation der Abschnitte, welche durch Deletion von zwanzig Aminosäuren verändert wurden.

Die 3D Struktur 4CBG (PDB Datenbank) wurde mit Hilfe von PyMol bearbeitet und betrachtet eine Untereinheit der Struktur. (A) Farbliche Markierung der einzelnen Abschnitte Δ1-Δ11. Die Farblegende wurde ins Schema eingearbeitet. (B) Zusammenfassung der Ergebnisse der Analyse der Immundetektionen der Deletionsmutanten. In Cyan markiert wurden die AS Abschnitte der Deletionen Δ2-Δ3, welche für die weitere Analyse ausgewählt wurden. Die magenta eingefärbten AS markieren den Bereich Δ4-Δ7, für den in den Proteinen die Bindung von Code4 unterbrochen war. Die Bereiche Δ1, Δ8-Δ11 wurden in der Struktur blau eingefärbt, der Abschnitt der restliche NS3 Helikase ist in grau dargestellt.

In Abbildung 42 wurden die Reste der Alaninpentamersubstitutionen markiert und zusätzlich in der Oberflächenansicht dargestellt. Die Farblegende befindet sich im Schema unterhalb der Sekundärstruktur. Die Oberflächendarstellung zeigt, dass sich die AS der Substitutionen #8, 10, 11 und #12 sich im gleichen Bereich der Struktur aneinander lagern (Abbildung 42B). Die in der Datenbank hinterlegte Kristallstruktur 4CBG wurde anhand einer CSFV NS3-Helikase aufgelöst. Um die Auswirkungen der geringen Sequenzunterschiede auf die Lage der Reste an der Oberfläche besser beurteilen zu können wurde in Abbildung 42C die AS-Sequenz an BVDV CP7 NS3 angepasst (E₃₈₃Q, F₃₈₄Y). Diese beiden AS

befinden sich im Bereich $\Delta 3$ am Übergang der Pentamersubstitutionen #10 zu #11. Durch die Anpassung der AS-Sequenz kommt es, wie vermutet, zur Verschiebung der Reste an der Oberfläche des Proteins. Im CP7 NS3 präsentieren sich die Reste der Substitutionen #8, #10 und #12 (Grün, Minzgrün und Cyan) aneinandergelagert (Abbildung 42C). Im CSFV NS3 wird dieses Triplet durch die Reste der Substitution #11 (Magenta, mit dem Stern markiert) unterbrochen und die AS der Substitutionen #8 und #10 werden im Protein etwas weiter auseinander positioniert (Abbildung 42B). Diese minimalen Unterschiede könnten Einfluss auf die Zugänglichkeit und Lage der AS für die Bindung des mAk haben.

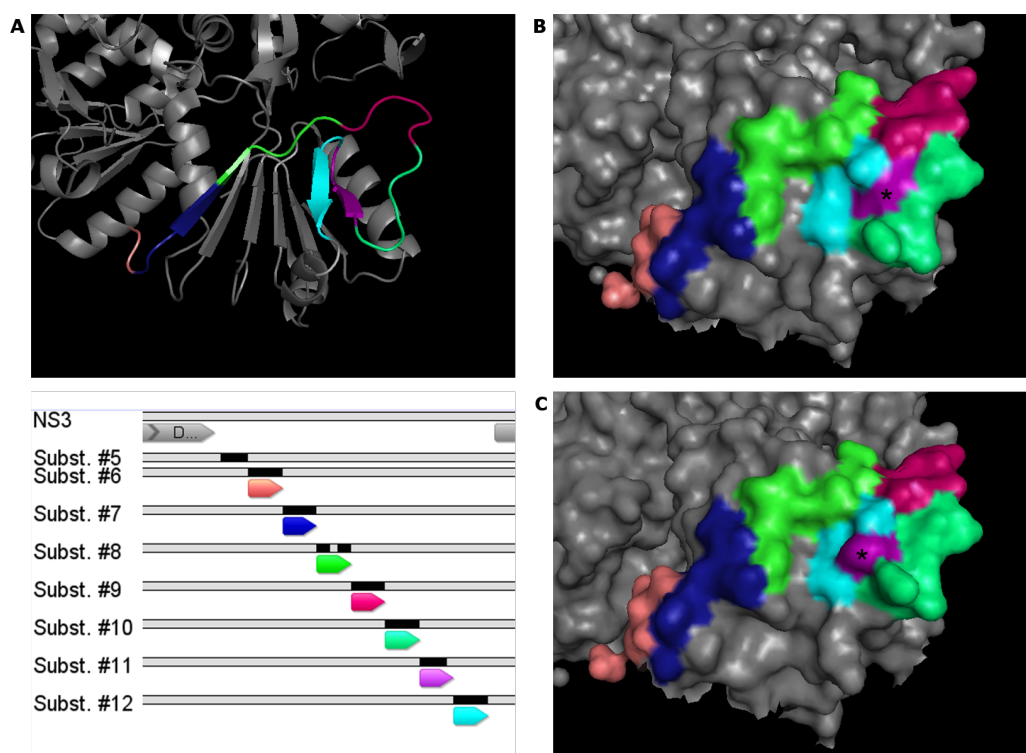


Abbildung 42: Lokalisation der Alaninpentamersubstitutionen in der 3D Struktur.

Die Legende gibt den Farbcode der einzelnen Substitutionen an. (A) Einfärbung der Bereiche der Alaninpentamersubstitutionen #6-12 in der Sekundärstrukturdarstellung. (B) Darstellung der Substitutionsbereiche in der Oberflächendarstellung des CSFV NS3. Der Stern markiert die Reste der Substitution #11. (C) Oberflächendarstellung des an die CP7 Aminosäuresequenz angepassten NS3 durch Mutationen $E_{383}Q$ und $F_{384}Y$. Der Stern markiert die Reste der Substitution #11.

Proteine, die die Alaninpentamersubstitution #9 enthielten fielen in den vorangegangenen Untersuchungen immer wieder als positive „Unterbrechung“ auf und führten, egal in welchem NS3-Typ, zu positive Signalen mit Code4. Deletion der fünf AS sowie Veränderungen der benachbarten Sequenzen im CP7 NS3 behinderten die Interaktion mit Code4 (Abbildung 29). In Abbildung 42 fällt auf, dass die AS des Substitutionsbereichs #9 deutlich als Schleife aus dem Protein herausragt. Diese Beobachtung könnte erklären, warum diese AS keine direkte Rolle für die Bindung des mAKs spielen, ergänzt so die bereits gewonnen Erkenntnisse und unterstützt die These, dass Code4 an ein konformationelles Epitop bindet (V.1.7).

Die in der vorliegenden Arbeit in NS3 eingeführten Alanindoppelmutationen wurden in Abbildung 43 in der an die CP7 Sequenz angepassten 4CBG E₃₈₃Q/F₃₈₄Y Struktur farblich markiert. Die Markierung der einzelnen Substitutionen ist im Schema dargestellt. In Abbildung 43C sind lediglich die vier AS markiert, die im CP7 NS3 den größten Effekt auf die Bindung von Code4 erreichten (#8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA und #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA). Anhand dieser Analysen kann man vermuten, dass die AS der Mutante 12.2 LK₃₉₀₋₃₉₁ einen Teil des Epitopes von Code4 darstellen, da diese AS an der Oberfläche des Proteins zwischen PE₃₇₂₋₃₇₃AA und LG₃₈₀₋₃₈₁AA präsent sind (Abbildung 43B in Pink, zwischen Cyan und Blau; Abbildung 43C in Grau zwischen Cyan und Blau). Diese Alanindoppelmutation wurde bisher noch nicht untersucht. Alaninpentamersubstitutionen, die diese AS ersetzen, führen zu negativen Ergebnissen mit Code4 in beiden Immunoassays.

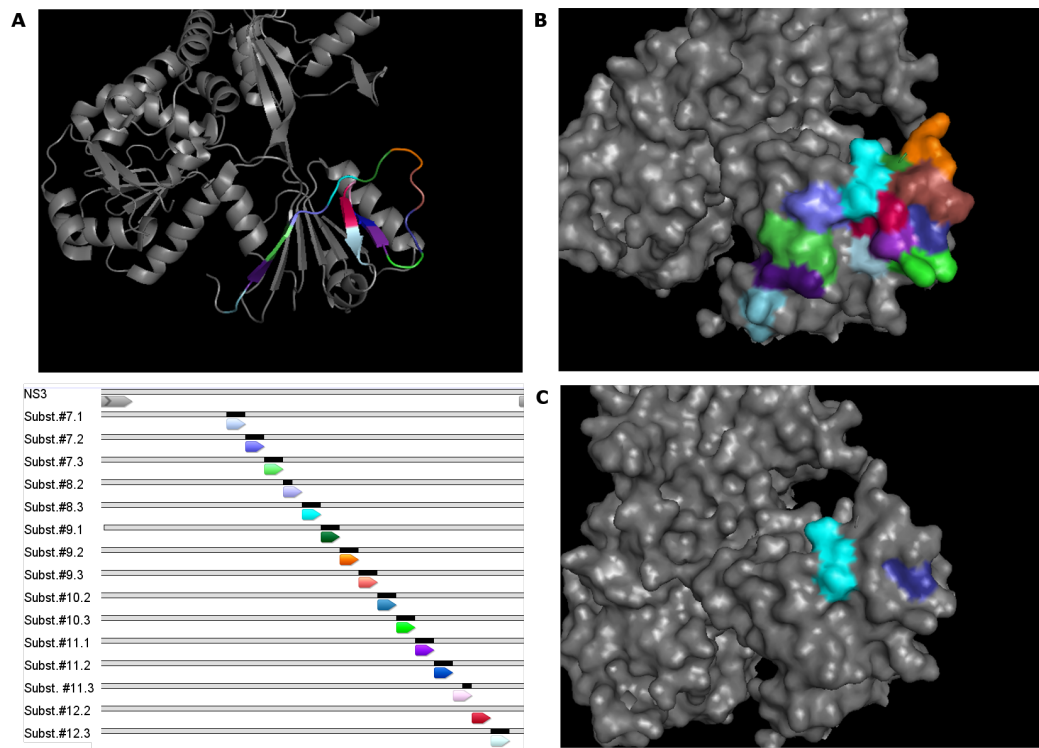


Abbildung 43: Lokalisation der Alanindoppelsubstitutionen in der 3D Struktur mit CP7 angepasster Aminosäuresequenz.

Die Legende gibt den Farbkode für die einzelnen Substitutionen an. (A) Einfärbung der Bereiche der Alanindoppelsubstitutionen in einer Untereinheit der Sekundärstruktur. (B) Oberflächenbetrachtung aller verschieden eingefärbten Doppelsubstitutions-bereiche. In der Oberflächenansicht sind alle Untereinheiten der 3D Struktur eingeblendet. (C) In dieser Darstellung wurden nur die beiden Substitutionsbereiche (#8.3 PE₃₇₂₋₃₇₃AA und #10.2 LG₃₈₀₋₃₈₁AA) mit dem größten Einfluss auf die Code4 Bindung im CP7 NS3 farblich markiert.

Zusammenfassend konnte der Bereich $_{364}\text{HPIEEFIAPE}_{373}[\dots]_{380}\text{LGSQFLDIAGLKIP}_{393}$ als Epitop kodierende Region für Code4 eingegrenzt werden. Für CP7 wurden die Reste PE₃₇₂₋₃₇₃ als essentiell für die Bindung bestätigt.

V. DISKUSSION

1.1. Die optimale Vakzine – eine Utopie?

Unter den zahlreich vorhandenen Infektionskrankheiten der Tiere sind besonders virale Infektionen von hoher Relevanz. Diese sind häufig für extrem hohe Fallzahlen und enorme wirtschaftliche Verluste verantwortlich. Interessanterweise sind ungefähr die Hälfte der bei der OIE gelisteten anzeigepflichtigen Tierkrankheiten viraler Natur (BRUN, 2016).

Prävention und Bekämpfung von Virusinfektionen durch Impfung stellt immer noch den Goldstandard dar. Impfungen sind die am häufigsten angewendete Strategie, um die Verbreitung viraler Infektionskrankheiten einzudämmen und im Idealfall auszumerzen. Eine bemerkenswerte Erfolgsgeschichte ist die Eradikation der Rinderpest (Rinderpest Virus, RPV). Dies ist die zweite Krankheit weltweit, die neben der Pockeninfektion beim Menschen mit Hilfe von Impfungen erfolgreich bekämpft werden konnte und als ausgerottet gilt. Als Hilfsmittel zur Bekämpfung der RPV wurde ein klassischer, attenuierter Lebendimpfstoff eingesetzt (BRUN, 2016). Diese Vakzineform zählt, neben den inaktivierten Totimpfstoffen, zu den konventionellen Impfstoffen, die heute jedoch häufig nicht mehr den gestiegenen Anforderungen an eine moderne Vakzine entsprechen.

Durch den Fortschritt im Bereich der Gentechnik können heute verschiedene Ansätze zur Entwicklung von Vakzinen verfolgt werden. Auch die unterschiedlichen neuen Impfstoffe lassen sich immer noch in zwei Gruppen, die replikationsfähigen Lebendimpfstoffe sowie die replikationsdefizienten Totimpfstoffe einteilen. Zu letzteren zählen konventionelle inaktivierte Impfstoffe, Subunit-, Peptid-, und DNA-Vakzinen. Vektorimpfstoffe können je nach Art des Vektors der einen oder anderen dieser Kategorien zugeteilt werden. Jegliche Form der modifizierten Lebendvakzine (MLV), die im Allgemeinen aus attenuierten Viren bestehen, fällt in die erste Kategorie. Diese Viren haben ihre pathogenen Eigenschaften verloren und lösen somit Infektionen ohne signifikante Symptome aus (MOENNIG & GREISER-WILKE, 2008). Die Attenuierung kann über konventionelle Methoden wie z.B. Passagierung der

Viren in Zellkultur oder gentechnische Modifizierung, z.B. durch Deletion oder Inaktivierung von Virulenzfaktoren, erreicht werden. Genetisch modifizierte Viren können einen deutlichen Vorteil in Bezug auf die Bewertung der Sicherheit der MLVs bieten. Die Virulenz wurde durch gezielte Mutationen reduziert und diese dafür verantwortliche Veränderung ist jederzeit überprüfbar. Veränderungen, die zur Attenuierung eines Virus, z.B. durch Passagen in Zellkultur führen, sind unkontrolliert, zahlreich und meist in ihren Mechanismen unverstanden (BRUN, 2016).

Ein großer Vorteil der replizierenden Impfstoffe, die für den Organismus eine natürliche Infektion imitieren, stellt die Menge und Vielfalt der Antigene dar, die die humorale und zellvermittelte Immunantwort stimulieren und so den replikationsdefizienten Impfstoffen in ihrer Effizienz deutlich überlegen sind. Die Wirkung klassischer Totimpfstoffe sowie von Subunit-Vakzinen beruht auf der Induktion einer schützenden Immunglobulin vermittelten Immunantwort durch eine AK-vermittelte Neutralisation zugänglicher Immunogene. Eine protektive Immunität ist i.d.R erst nach mehreren Auffrischungsimpfungen erreichbar, im Gegensatz zu MLVs, die meist bereits nach der ersten Impfung die Entwicklung einer belastbaren Immunität induzieren (BRUN, 2016).

MLVs begleiten jedoch meist gewisse Vorbehalte bezüglich der Sicherheit. Faktoren sind das Reversionspotential attenuierter Varianten hin zu virulenteren Stämmen und die Übertragung auf andere empfängliche Tiere sowie auf Föten im trächtigen Tier. Diese Sicherheitsbedenken können wie bereits oben erwähnt für genetisch modifizierte Vakzine etwas weniger ausgeprägt sein als für konventionell hergestellte MLVs (HENDERSON, 2005; BRUN, 2016). Eine Gefahr, die die Produktion lebender Impfstoffe mit sich bringt, ist die Erzeugung von Impfwischenfällen durch Kontamination der Vakzine mit einem anderen infektiösen Agens (RIDPATH, 2013). Ein Beispiel für eine solche Kontamination ist in Chargen eines Impfstoffes gegen die Infektiöse Bovine Rhinotracheitis (IBR, Bovines Herpesvirus 1) aufgetreten. Diese fragliche Impfstoffpräparation wurde vermutlich mit ungenügend inaktiviertem und BVDV-2 kontaminiertem fötalen Kälberserum hergestellt. So kam es zum Ausbruch von BVD in mit der IBR-Vakzine geimpften, empfänglichen Tieren (BARKEMA et al., 2001).

Die Anforderungen an einen optimalen Impfstoff sind hoch. Attribute, die eine solche Vakzine ausmachen, sind zum einen die schnelle Induktion einer langanhaltenden, protektiven Immunität, die gegen alle Varianten des Virus gerichtet ist. Abhängig vom zu bekämpfenden Pathogen kann es erforderlich sein, dass die Vakzine mehrere Immunogene enthält, um dies zu garantieren. Des Weiteren sollte der Impfstoff vor der klinischen Ausprägung einer Infektion und vor Ausbildung eines unbemerkten Überträgerzustandes schützen. Induzierte Herdenimmunität sollte horizontale sowie vertikale Ausbreitung der Erreger verhindern und somit Neuinfektionen wirksam verhindern. Es steht außer Frage, dass Impfstoffe keine kurzfristigen oder Langzeit-Nebenwirkungen hervorrufen sollten. Bei attenuierten Lebendvakzinen muss die Stabilität der abschwächenden Veränderung gewährleistet werden. Auch nach potentiellen Rekombinationsereignissen sollten die entwickelten Impfstoffe keine Gefahr für die Zielspezies oder andere empfängliche Wirte darstellen. Weitere Anforderungen betreffen die einfache, stetige und kostengünstige Herstellung, die wiederum den Vertrieb von günstigen Vakzinen ermöglicht. Diese sollten für die Anwendung in der Praxis einfach zu handhaben sein. Das Impfregime sollte am besten nur eine, maximal zwei Immunisierungen vorsehen. Das letzte Attribut, das eine optimale Vakzine mitbringen sollte, ist ein Markerkonzept in Verbindung mit einem hoch sensitiven, spezifisch differenzierenden serologischen Test (VAN OIRSCHOT, 2001; DONG & CHEN, 2007).

Nimmt man all diese Anforderungen zusammen, so erscheint die optimale Vakzine fast als eine Utopie. Die Bestrebungen, einen Impfstoff zu entwickeln, der (nahezu) perfekt ist, ist das erklärte Ziel der Vakzineforschung. Wichtig ist hierbei: Neu entwickelte Impfstoffe sollten mindestens dieselbe Wirksamkeit besitzen, wie die beste Vakzine, die bereits auf dem Markt erhältlich ist (VAN OIRSCHOT, 2001).

1.2. Virulenzfaktoren – vom Wissen und Nicht-Wissen um biologische Funktionen

Die Basis zur Entwicklung neuartiger Vakzine, egal welchen Typs, bildet die molekularbiologische und immunologische Grundlagenforschung. Diese beinhaltet das bessere Verständnis der Pathogenese der erregerbedingten

Erkrankungen, der Interferenz der Pathogene mit dem angeborenen und adaptiven Immunsystem sowie die Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzfaktoren. Verschiedene Proteine bzw. Proteinfunktionen wurden als Virulenzfaktoren beschrieben, doch trotz intensiver Forschung der letzten Jahre sind noch viele Fragen offen, viele solcher Faktoren vermutlich noch nicht entdeckt und die biologischen Funktionen und Wirkungsweisen bekannter Faktoren noch lange nicht aufgeklärt.

Zu den Proteinen, denen eine Funktion als Virulenzfaktor für Pestiviren zugeschrieben wird, zählen N^{pro}, das C-Protein, die Strukturproteine E^{ns}, E1 und E2 sowie die Nichtstrukturproteine p7, NS2-3 und NS4B (LEIFER et al., 2013; BEER et al., 2015). Interessanterweise brachten Sequenzvergleiche zwischen den durch Passagen attenuierten Impfstämmen und deren pathogenen Ausgangsviren keine schlüssigen Antworten auf die Frage nach den Virulenzdeterminanten. In diesem Vergleich konnten in den durch Passagen attenuierten Impfstämmen zahlreiche Mutationen über das gesamte Genom verteilt gefunden werden, die vermutlich im Kontext miteinander zur Abschwächung des Virus führen (ISHIKAWA et al., 1995; LEIFER et al., 2013).

In einem umgekehrten Ansatz zur Bestimmung von Virulenzdeterminanten wurde der attenuierte CSFV-Impfstamm GPE⁻ artifiziell in vivo passagiert. Nach Passagen im Tier konnte ein pathogenes Virus isoliert werden, welches Mutationen in E2 und NS4B aufwies. Weitere Untersuchungen bestätigten, dass diese Veränderung für die wiedergewonnene Pathogenität verantwortlich waren (TAMURA et al., 2012). Biostatistische Analysen der evolutionären Entwicklung der E2-Sequenz weisen auf einen Zusammenhang zwischen adaptiven Veränderungen und Virulenz hin (WU et al., 2010). Das hochimmunogene E2 wurde bereits in vorherigen Untersuchungen als Virulenzfaktor des CSFV vorgeschlagen (VAN GENNIP et al., 2004; RISATTI et al., 2005a). Veränderungen am hochkonservierten, für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern bekannten TAV-Epitop führten zu Attenuierung in vivo (RISATTI et al., 2006). Diese Beobachtung konnte von unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (WIRTZ, 2013). Veränderungen an den Glykosilierungsstellen des Proteins E2, aber auch der anderen beiden Glykoproteine E1 und E^{ns} ziehen Veränderungen im Phänotyp nach sich. Die Mechanismen dieser Veränderungen sind jedoch

noch nicht bekannt. In den meisten Fällen führten die Veränderungen an den Glykosilierungsstellen der Strukturproteine jedoch zu einem deutlichen Wachstumsnachteil der Mutanten gegenüber dem Ausgangsvirus (RISATTI et al., 2005b; RISATTI et al., 2007; SAINZ et al., 2008; FERNANDEZ-SAINZ et al., 2009).

Deletion des C-Proteins, aber auch Mutationen, die selektive Protein-Protein-Interaktionen des Proteins mit zellulären Faktoren beeinflussen, führten zur Attenuierung von CSFV in vivo (GLADUE et al., 2010; GLADUE et al., 2011).

Für N^{pro} konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des für das Protein kodierenden Abschnitts in Zellkultur kaum Nachteil für das Virus bringt, aber zu einem attenuierten Phänotyp im natürlichen Wirt führen kann (MAYER et al., 2004). Der Versuch, die dem N^{pro} zugeschriebene Interferenz mit dem angeborenen Immunsystem mit der beobachteten Attenuierung der Deletionsmutanten in Verbindung zu bringen, zeigte, dass diese nur bedingt zur Virulenz eines Stammes beiträgt. Der Block der IFN α / β -Induktion durch N^{pro} scheint eher ein Co-Faktor für Virulenz der Viren zu sein (RUGGLI et al., 2009; TAMURA et al., 2014). Dies unterstützt Analysen unserer Arbeitsgruppe, in denen eine N^{pro} Deletion, die keinen Replikationsnachteil in vitro mit sich brachte, in vivo zu keiner Abschwächung des Virus führte (G. Meyers, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise kann die Kombination aus der oben genannten Deletion des N^{pro} mit einer zweiten attenuierenden Mutation, die zur Ausschaltung der RNase-Funktion des E^{ns} führt, die Etablierung einer persistenten Infektion mit ncp-BVDV verhindern (MEYERS et al., 2007).

1.3. Gezielte Attenuierung von Pestiviren – E^{ns} dimerisierungsnegative Mutanten

Homodimerbildung gehört zu den Besonderheiten des E^{ns} Proteins. Die Disulfidbrücke, die zwei E^{ns}-Monomere kovalent verbindet, wird durch das am weitesten stromabwärtsgelegene Cystein 171 vermittelt (LANGEDIJK et al., 2002). Dieses letzte von neun Cysteinen ist nur in sehr wenigen Pestivirusisolaten nicht konserviert. Analysen der Einträge in der Referenzdatenbank ergaben jedoch für die Stämme, zu denen diese Isolate gehören, keine klaren Aussagen über die Existenz des Cysteins 171, da für diese Stämme Mehrfacheinträge vorhanden sind. Diese enthalten z.T. ein Cysteincodon, während andere dort

eine abweichende Sequenz aufweisen (VAN GENNIP et al., 2005; TEWS et al., 2009). Das natürliche Vorkommen von zwei eindeutig dimerisierungsnegativen Stämmen bestätigte aber vorab, dass solche Viren lebensfähig sind. In vitro Untersuchungen ergaben, dass CSFV- sowie BVDV-Mutanten, ohne die Fähigkeit stabile E^{ns}-Dimere zu bilden, keinen signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber den dimerisierungspositiven Ausgangsviren zeigten (VAN GENNIP et al., 2005; TEWS et al., 2009). Im Tier führt das Unterbinden der E^{ns}-Dimerbildung durch Mutation oder Deletion des Cysteincodons 171 jedoch zu einer deutlichen Attenuierung des Virus. Die Ausprägung des Phänotyps der dimerisierungsnegativen Viren ist mit dem der fast apathogenen Viren nach Ausschalten der RNase-Funktion im gleichen Protein vergleichbar (TEWS et al., 2009). Die RNase-Funktion der dimerisierungsnegativen Mutanten ist nach in vitro Tests jedoch intakt.

Der vorliegenden Arbeit zur Auswirkung einer Pseudoreversion im E^{ns} auf Regenerierung der Virulenz eines zuvor gezielt attenuierten Virus lagen Ergebnisse aus In-vivo-Studien zweier vorangegangener Dissertationen zugrunde (SCHÜRMANN, 2010; WIRTZ, 2013). Eva Schürmann untersuchte in ihrer Arbeit die Auswirkungen verschiedener C171-Mutanten (EP 82/2, C₁₇₁S; EP 82/1, C₁₇₁F; und EP 82/4, C₁₇₁Δ) auf den Phänotyp im natürlichen Wirt. Hierbei konnte sie beobachten, dass Mutanten, die die Deletion des C₁₇₁ oder die Mutation C₁₇₁S enthielten, eine deutliche Attenuierung aufwiesen. Diese Mutanten waren in ihrer klinischen Ausprägung, ähnlich der RNase negativen Virusmutante, schon fast als avirulent zu bezeichnen. Tiere, die mit der Mutante C₁₇₁F infiziert wurden, zeigten im Verlauf des Versuches ein anderes Bild. Diese Tiere entwickelten deutliche Krankheitssymptome, die allerdings milder waren als bei den Tieren der Kontrollgruppe des Versuches. Sequenzanalysen der aus Lymphozyten reisolierten Viren wiesen entweder eine Reversion an Position 171 zurück zum Cystein oder eine Pseudoreversion an Position 209 auf. Diese Pseudoreversion führte zu einem Austausch des Serins 209 zu Cystein. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die so veränderte E^{ns}-Sequenz wieder die Ausbildung der Homodimere über die Ersatzbindungsstelle 209 ermöglichte. Die Pseudoreversion S₂₀₉C konnte interessanterweise auch in einem zweiten Tierversuch nachgewiesen werden, in dem die Deletionsvariante (C₁₇₁Δ)

charakterisiert wurde. In diesem Fall zeigte das Virus trotz nachweislicher Pseudoreversion einen attenuierten Phänotyp im Tier. Es stellte sich nach diesem Versuch jedoch die Frage, ob der biologische Vorteil, den dimerisierungsfähige Viren scheinbar besitzen, aufgrund des Zeitpunkts der Pseudoreversion im Versuchsverlauf und der damit bereits ausgelösten Immunreaktion nicht mehr zum Tragen kam (SCHÜRMANN, 2010). Alternativ könnte die Deletion des Codons 171 einen größeren Störfaktor für das Protein im Vergleich zur Punktmutation darstellen und so die Regenerierung des pathogenen Phänotyps durch Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit nicht erreicht werden. Dennoch scheint es im Verlauf der Infektion einen Selektionsdruck hin zu den dimerpositiven Virusvarianten zu geben. Wo der genaue biologische Vorteil der E^{rns}-Dimere zum Tragen kommt, kann bisher nur spekulativ beantwortet werden (s.u.). Um die Auswirkung der Pseudoreversion in vivo besser beurteilen zu können, wurden Kombinationsmutanten generiert. Diese enthielten entweder die Deletion des Codons 171 oder die Punktmutation C₁₇₁S in Kombination mit der Pseudoreversion S₂₀₉C (849, C₁₇₁Δ/S₂₀₉C und 1990CIII, C₁₇₁S/S₂₀₉C; WIRTZ (2013)). Die Tierstudie, in der diese Kombinationsmutanten mit dem Ausgangsvirus Alfort/Tübingen verglichen wurden, ergab erneut ein heterogenes Bild, bestätigte aber grundsätzlich die Beobachtungen der vorangegangenen Studien. Die Deletionspseudorevertante (C₁₇₁Δ/S₂₀₉C) wies eine im Tier vergleichbare Attenuierung auf wie die einfache Deletionsvariante (C₁₇₁Δ). Die Kombination aus Punktmutation und Pseudoreversion (C₁₇₁S/S₂₀₉C) führte zu ausgeprägteren klinischen Symptomen, ähnlich den Beobachtungen bei der Studie, bei der die Pseudoreversion zum ersten Mal beobachtet werden konnte. Interessant war dabei der deutliche Unterschied der attenuierten fast apathogenen Ausgangsvariante C₁₇₁S zum deutlich pathogenen Virus mit der Kombination C₁₇₁S/S₂₀₉C (WIRTZ, 2013). Der Unterschied zwischen den beiden Viren besteht in der Fähigkeit E^{rns} Homodimere zu bilden.

1.4. Pathogenitätsstudien zur Überprüfung des Rückgewinns von Virulenz durch Pseudoreversion und Reetablierung kovalenter Dimere

Um die Relevanz der Dimerisierung und der Restaurierung der Virulenz durch die Pseudoreversion besser beurteilen zu können, sollten diese beiden Virusmutanten noch einmal in einem Versuchsaufbau direkt miteinander verglichen werden. Hierfür wurden die Pathogenitätsstudien #61/13 und #02/15 durchgeführt, in denen jeweils vier Schweine pro Gruppe mit EP82/2 (C₁₇₁S), 1990CIII (C₁₇₁S/S₂₀₉C) oder dem Ausgangsvirus 1347 RTFIII infiziert wurden. In beiden Studien konnte eine deutliche Abstufung der klinischen Ausprägung der drei zu untersuchenden Virusvarianten beobachtet werden und somit die Ergebnisse der vorangegangenen Studien bestätigt werden. Als attenuiert, nahezu apathogen, lässt sich das dimerisierungsnegative Virus EP82/2 (C₁₇₁S) beschreiben. Tiere, die mit diesem Virus infiziert wurden, zeigten insgesamt nur geringfügige Abweichungen von den Normwerten, etwas geringere Viruslasten sowie eine gute Induktion der Immunantwort. Nur jeweils ein Tier stach pro Studie etwas heraus: OM# 43/3 (#61/13) sowie OM#4 (#02/15). Der Anstieg der klinischen Punktzahl sowie der Temperatur von OM#43/3 ließen sich nach der pathologischen Untersuchung mit einer aufgestiegenen bakteriellen Infektion begründen. Für OM#4 ließ sich kein solcher Befund nachweisen. Auch ergaben sich keine Hinweise auf eine Reversion bzw. Pseudoreversion des Virus. Die Auswirkung einer Infektion, auch mit einem attenuierten Virus, hängt stark vom jeweiligen Tier ab und die beobachtete Symptomatik war so geringgradig, dass sie auch mit der individuellen Reaktion begründet werden könnte.

Als moderat virulent im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich die Pseudorevertante 1990CIII (C₁₇₁S/S₂₀₉C) im Tier. Betrachtet man beide Versuche, so liegen die aufgezeichneten Werte der klinischen Punktzahlen, die Viruslasten im Blut und die Anzahl der viruspositiven Anzuchten aus Leukozytenpräparationen in der Regel abgestuft zwischen denen der Gruppen 1 und 3. Die erste Pathogenitätsstudie (TV #61/13) ergab Hinweise hierauf, doch der Verlust von insgesamt 50% der Tiere dieser Gruppe ließ keine finale Schlussfolgerung zu. Es ist zu erwähnen, dass die Euthanasie des Tieres OM# 50/5 nicht mit dem

Infektionsverlauf zusammen hing, sondern äußeren Umständen geschuldet war. Der beobachtete Phänotyp mit moderater Virulenz im Vergleich zum Wildtypvirus wurde von der zweiten Studie (TV #02/15) bestätigt, auch wenn in dieser insgesamt die Verläufe etwas milder waren als in der ersten Studie. Dies gilt auch für die Kontrollgruppe mit einem etwas langsameren Verlauf und niedrigeren Viruslasten. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt vermutlich auch in der individuellen Belastbarkeit der Tiere, die Infektionsstudien zu einem gewissen Grad beeinflussen kann. Zu den vorliegenden Studien ist anzumerken, dass die Tiere jeweils von verschiedenen Betrieben angeliefert wurden und die Tiere der zweiten Studie bereits nach Anlieferung weniger stressanfällig waren als die Tiere der ersten Studie. Dennoch entwickelten alle Tiere der Kontrollgruppen deutliche klinische Symptome und wurden wie erwartet moribund, wenn auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Studien. Die Ergebnisse beider Studien stützen die These, dass kovalent verbundene E^{rns} Dimere dem Virus einen biologischen Vorteil verschaffen und eine Rolle für die Virulenz des Virus spielen. Dass die Dimerisierung einen Einfluss auf die Funktion eines Proteins haben kann, wurde von KIM et al. (1995b) anhand einer anderen als Dimer vorliegenden, sekretierten RNase, der „Bovinen Seminalen“-Ribonuklease (BS-RNase) gezeigt. Obwohl das Monomer eine aktive RNase Funktion besitzt, ist nur das natürlich vorkommende Dimer biologisch aktiv und besitzt zytotoxische Eigenschaften. Die monomer vorkommende RNase A, welche große sequenzielle Ähnlichkeit mit der BS-RNase besitzt, wird moderat zytotoxisch, wenn sie als synthetisch hergestelltes Dimer vorliegt (KIM et al., 1995b). Eine Erklärung hierfür bietet die Erkenntnis, dass die als Dimer vorliegende BS-RNase resistent gegenüber der Hemmung durch in der Zelle vorkommende, stark affine Ribonuklease Inhibitoren (RI) ist (KIM et al., 1995a; LEE & RAINES, 2005). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für das pestivirale E^{rns} in Frage kommen. Anhand dieser Theorie könnte man die nicht komplett regenerierte Virulenz der Pseudorevertante wie folgt erklären: Die Pseudorevertante bildet die Dimere über eine Cystein-Ersatzbindungsstelle, die sich sehr weit stromabwärts im Membrananker des Proteins befindet. Somit könnte dieses Dimer in der Ausrichtung der beiden Proteine zueinander nicht so ideal die Inhibierung durch RIs verhindern wie es im natürlich vorkommenden

Dimer der Fall ist. Eine andere Theorie, die versucht zu erklären, weswegen die Pseudorevertanten-Dimere nicht die Effizienz der Wildtyp-Dimere erreichen, bezieht sich auf die möglichen Unterschiede in der katalytischen Aktivität und Substrataffinität. Vergleichende In-vitro-Experimente ergaben, dass die Affinität des Substrates im Dimer erhöht ist, vermutlich auf Grund der doppelten Anzahl an positiv geladenen Bindungsstellen im aktiven Zentrum. Die katalytische Reaktion läuft aber im Vergleich zum Monomer verlangsamt ab, was auf den behinderten Substrat-Produktaustausch durch den im Dimer eingeschränkten Zugang zum aktiven Zentrum zurückzuführen ist (KREY et al., 2012; TAUTZ et al., 2015). Eventuell werden beide Parameter wiederum durch die nicht „optimale“ Pseudorevertanten-Dimerbildung beeinflusst. Diese Frage konnte in den Experimenten von KREY et al. (2012) nicht beantwortet werden, da in diesen Untersuchungen ein Protein analysiert wurde, dem der Membrananker des Proteins fehlte. Die Kristallstruktur lässt auch das Cystein 171 vermissen, so dass über die Lage dieser wichtigen AS keine strukturabgeleiteten Hypothesen aufgestellt werden noch der Unterschied der Deletions- ($C_{171}\Delta/S_{209}C$) zur Mutationspseudorevertante ($C_{171}S/S_{209}C$) betrachtet werden konnte.

Die Lokalisation der Pseudoreversion, die auf Proteinebene die Veränderung des Serins zum Cystein an Position 209 bewirkt, gibt weitere Rätsel auf. Diese liegt im Bereich des außergewöhnlichen Membranankers des E^{rns} , in einer Region des Proteins, die eigentlich in der Membran versenkt ist und für die kein Kontakt zu Wasser nachweisbar war (ABERLE et al., 2014). Ein weiterer interessanter Fakt ist, dass die der Pseudoreversion direkt benachbarte AS Leucin 208 Teil des Retentionssignales des Proteins ist. Veränderungen des L_{208} hat dramatische Auswirkungen auf die intrazelluläre Lokalisation des Proteins (BURRACK et al., 2012). Eine solche Auswirkung der Pseudoreversion konnte nicht beobachtet werden. Auch ein Einfluss auf die Retention/Sekretion des Proteins war nicht nachweisbar (G. Meyers, unveröffentlichte Daten). Mutationen an Position 209 des E^{rns} -Proteins wurden aber bereits in einem anderen Zusammenhang beschrieben. In mehreren Publikationen wurde eine anpassende Mutation des CSFV an die Vermehrung in Zellkultur festgestellt, wodurch es zu einer gesteigerten Affinität des E^{rns} zu Heparansulfatresten auf der Oberfläche der verwendeten Zellkulturzellen kommt. Im Detail führt die Mutation des Serins zu

Arginin an Position 209 (S₂₀₉R) zu gesteigerten Titern in SK-6 Zellen (HULST et al., 2000). Ähnliche Veränderungen, die nach Zellkulturpassagen des Maul-und-Klauenseuche-Virus sowie des Sindbis-Virus beschrieben wurden, führten zu Attenuierung dieser Viren (SA-CARVALHO et al., 1997; KLIMSTRA et al., 1998). Im CSFV-Kontext konnte diese Beobachtung für die Mutation S₂₀₉R nicht bestätigt werden (HULST et al., 2001). In einer zweiten Studie mit einem hochvirulenten CSFV Stamm wurde nochmals die Auswirkung der anpassenden Doppelmutation ST₂₀₉₋₂₁₀RI auf den Phänotyp in vivo überprüft. Hier zeigte sich eine geringfügige Attenuierung (MAYER et al., 2003). Für die Beobachtungen der vorliegenden sowie der vorangegangenen Arbeiten, dass Mutations- sowie Deletionspseudorevertante trotz intakter Dimerbildung in ihrer Virulenz nicht dem Wildtypvirus entsprechen, ist es nicht auszuschließen, dass die Pseudoreversion an Position 209 einen gewissen attenuierenden Effekt hat. Eventuell beruht die Wirkung dieser Veränderung aber auch auf noch unbekannten Mechanismen oder Funktionen des E^{ns}. Da die Virulenz eines Virus immer von mehreren Faktoren beeinflusst wird, lässt sich letztgenannte Hypothese nicht grundsätzlich ausschließen. Zusammengefasst stützt die vorliegende Arbeit die These, dass die Fähigkeit des E^{ns} kovalent verbundene Dimere zu bilden, einen Virulenzfaktor des CSFV darstellt. Im Umkehrschluss wurde gezeigt, dass die Attenuierung des Virus durch Pseudoreversion partiell aufgehoben werden kann und es somit durch die wiedergewonnene Fähigkeit zur Dimerbildung zu einem Rückgewinn der Virulenz des Virus kommt. Dies ist der endgültige Beweis des Zusammenhangs von E^{ns}-Dimerisierung und Virulenz.

1.5. Das DIVA-Prinzip –Markierungskonzepte für Impfstoffe

1999 prägte J.T. van Oirschot den Begriff der DIVA-Vakzine. **D**ifferentiating **I**nfected from **V**Accinated individuals, später **D**ifferentiating **I**nfected from **V**accinated **A**nimals, sollte das Prinzip der Markervakzine besser definieren (VAN OIRSCHOT, 1999; VAN OIRSCHOT, 2001). Dieses basiert nicht, wie der Begriff Marker impliziert, auf den Unterschieden der Vakzine zum Feldvirus sondern auf der Möglichkeit, die induzierte Immunantwort des infizierten von der des geimpften Tieres zu differenzieren. Die Vakzine enthält hierfür zumindest ein immunogenes Protein oder Epitop weniger (Negativmarker) oder mehr

(intrinsische oder extrinsische Positivmarker) als das korrespondierende Feldvirus (VAN OIRSCHOT, 1999, 2003; DONG & CHEN, 2007). Die Entwicklungen von DIVA-Vakzine-Kandidaten der letzten Jahre verfolgten meist das Prinzip des Negativmarkers. Auch wenn sich Positivmarker gut zur Identifizierung geimpfter Tiere eignen, sind sie für die Anwendung in Eradikations- und Kontrollprogrammen eher ungeeignet. Für diese Programme ist es vonnöten, den Eintrag von Feldvirus in eine geimpfte Herde detektieren zu können und somit vorrangig das infizierte und nicht das geimpfte Tier zu identifizieren (VAN OIRSCHOT, 1999). Ein zur Vakzine gehöriger, speziell entwickelter serologischer Test sollte diese Differenzierung auf Basis der ausbleibenden Immunreaktion gegen das fehlende Einzelprotein oder Epitop sicher ermöglichen. Dieses Prinzip konnte bereits erfolgreich im Kontrollprogrammen für die Aujeszky'sche Krankheit beim Schwein (Pseudorabies-Virus) genutzt werden (VANNIER et al., 2007).

1.6. Entwicklung von DIVA-Strategien für BVDV und CSFV

Auch im Zusammenhang mit pestiviralen Vakzinen wird intensiv über die Implementierung von DIVA-Strategien diskutiert. Hierbei sind die verschiedenen Ausgangssituationen zur Bekämpfung von BVDV und CSFV gesondert zu beachten.

Kontrollprogramme für BVDV unterliegen im Gegensatz zu CSFV keiner EU-Bestimmung und werden nach nationalen oder regionalen Bestimmungen durchgeführt. In manchen Ländern wird nur auf Herdenbasis und somit nicht systematisch Bekämpft, beispielsweise in unserem Nachbarland Frankreich. Diese unterschiedlichen Bestimmungen führen zu Handelseinschränkungen und es besteht ein gewisses Einschleppungsrisiko von BVDV. In den USA trägt BVDV auf Grund des fehlenden systematischen Eradikationsprogramms zu enormen wirtschaftlichen Verlusten bei, obwohl zahlreiche Vakzine zur Verfügung stehen. Besonders zu Beginn eines solchen Programmes, können Impfstoffe bei hohen Tierzahlen, intensivem Handel und hoher BVDV-Prävalenz einen Vorteil gegenüber einem Programm ohne Impfung bieten. Das Augenmerk liegt jedoch immer auch auf betriebliche Hygienemaßnahmen und vor allem dem Ausmerzen des Virusreservoirs PI-Tier. Impfstoffe, die vor fötaler Infektion schützen, bieten

hierfür einen deutlichen Vorteil und könnten zur Differenzierung der durch die Vakzine induzierten Antikörper mit einem DIVA-Ansatz kombiniert werden.

Eine DIVA-Strategie ist immer von Vorteil, wenn der Status „frei von einer Krankheit“ trotz der Anwendung von Impfstoffen bei einem Krankheitsausbruch aufrechterhalten werden soll. In Europa wird zwischen BVDV-unverdächtigen Betrieben, d.h. in Tests konnte kein Virus aber Antikörper gegen BVDV nachgewiesen werden und BVDV-freien Betrieben (kein Virus und keine Antikörper in der Probe) unterschieden. Hat ein Betrieb den Status BVDV-frei könnte eine Einschleppung eines BVDV fatale Folgen haben, da keines der Tiere im Bestand durch Antikörper gegen die Krankheit geschützt ist. Eine zugelassene Markervakzine könnte in diesem Fall eingesetzt werden, um Tiere zu schützen ohne den Bestandsstatus längerfristig zu beeinträchtigen, da die Herkunft der Antikörper in den Proben eindeutig zugeordnet werden könnte.

Mittlerweile haben nicht nur Betriebe sondern auch einige Staaten den Status BVDV-frei (Schweden, Norwegen und Dänemark). In diesen Ländern sind Impfungen gegen BVDV nicht zulässig. In Deutschland wird der „BVDV-frei“ Status derzeit nicht angestrebt, da die Impfung gegen BVDV weiterhin möglich bleiben soll. Eine DIVA-Vakzine, die neben solidem Schutz für Rinder und Föten auch die Möglichkeit der Differenzierung der Antikörperherkunft bietet, könnte zu einem Umdenken in Bezug auf die Statusbestrebungen führen (ENGELS, 2015).

Es wurde bereits untersucht, ob sich inaktivierte Impfstämme in Kombination mit kommerziellen NS3 „blocking“ ELISA-Systemen als DIVA-System implementieren lassen. Diese Untersuchungen basieren auf der Annahme, dass nach Impfung mit inaktivierten Impfstämmen keine Replikation stattfindet und somit die Induktion von detektierbaren Antikörpern gegen NS3 ausbleibt (MAKOSCHEY et al., 2007; RAUE et al., 2011). Dieses System entspricht aber nicht dem vorgeschlagenen DIVA Konzept, da die Vakzine selbst keinen immunogenen Marker mehr oder weniger enthält als das korrespondierende Ausgangsvirus. In einer grösser angelegten Studie konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität des Systems nicht ausreichend ist. Die beobachteten Reaktionen geimpfter Tiere lassen sich im ELISA nicht sicher von denen der Frühphase einer Feldinfektion abgrenzen (RAUE et al., 2011). Impfungen mit attenuierten Lebendvakzinen ermöglichen

derzeit ebenfalls keine serologische Differenzierung, weil keine dieser Vakzine eine Markierung beinhaltet. Dies gilt auch für die neu auf den Markt gekommene Vakzine Bovela® (Boehringer Ingelheim Vetmedica), die Schutz gegen beide BVDV-Typen vermittelt und sicher in der Anwendung im trächtigen Tier ist.

Mehr im Fokus lag die Entwicklung von CSFV-Marker-Vakzinen. In der EU gibt es derzeit ein Impfverbot gegen CSFV. Impfstoffe dürfen nur im Zuge eines Notfallimpfplanes, der durch eine EU-Kommission geprüft werden muss, zum Einsatz kommen. Ein DIVA-System würde einen deutlichen Vorteil für die Anwendung eines Impfstoffs bei der Implementierung eines solchen Notfallimpfplanes im Falle eines Seuchenausbruches bieten. In Gebieten, in denen CSFV immer noch endemisch ist, könnte ein solcher Impfstoff Teil eines Eradikationsprogrammes werden. Mittlerweile sind einige CSFV-Vakzinen in Deutschland zugelassen, die Markierungseigenschaften besitzen, aber auch die klassische, durch Passagen attenuierte Lebendvakzine ohne DIVA-System, die am schnellsten sicheren Schutz vermittelt (Riemser Schweinepestvakzine, IDT Biologika GmbH; Pestiffa CL, Merial GmbH). Zu den zugelassenen Impfstoffen, die Markereigenschaften besitzen, zählt zum einen die auf dem Hauptimmunogen E2 basierende Subunit-Vakzine (Porcilis Pesti, Intervet International BV) sowie die BVDV-CSFV-Chimäre CP7_E2alf, die im BVDV Grundgerüst statt des eigenen E2 das CSFV E2 als Immunogen enthält (Suvaxyn®CSF Marker, Zoetis). Die CSFV spezifische Immunreaktion im Empfängertier ist somit nur gegen E2 gerichtet. Der differenzierende Test kann somit auf der Detektion von Antikörpern, die bei einer Feldinfektion gegen die anderen immunogenen CSFV Proteine gebildet werden, basieren. So kann mit einem CSFV-E^{rns}-ELISA sicher zwischen geimpft und infiziert unterschieden werden. Anti-E^{rns}-ELISA sind jedoch deutlich weniger sensitiv als Anti-E2-ELISA-Systeme (FLOEGEL-NIESMANN, 2001; DONG & CHEN, 2007). Zusätzlich ist das verzögerte Einsetzen einer belastbaren Immunität durch die Subunit-Vakzine, für deren bessere Wirkung ein Impfschema mit „Booster“-Impfung notwendig ist, ein weiteres Manko (UTTENTHAL et al., 2001; VANNIER et al., 2007).

Den schnellsten belastbaren Schutz gegen Virusinfektionen induzieren immer noch attenuierte Lebendvakzine. Um diese MLV mit einem Markierungssystem kombinieren zu können, aber auch für die potentielle Anwendung in

Peptidvakzinen oder der Diagnostik (z.B. ELISA, Fluoreszenzpolarisations Assay, kolloidal Gold Immunassay) wurden in den letzten Jahren immundominante Regionen sowie einzelne hochkonservierte Epitope der drei Hauptimmunogene E2, E^{rnS} sowie NS3 kartiert (VAN RIJN et al., 1994; DEREGT et al., 1998; LIN et al., 2000; CHRISTMANN et al., 2001; ARMENGOL et al., 2002; BROWN et al., 2002; DEREGT et al., 2005; DONG et al., 2006; ZHANG et al., 2006; LI et al., 2013). Ein Beispiel für die Anwendung eines solchen Konzepts ist die Veränderung des hochkonservierten CSFV-E2-Epitops „TAVSPTTLR“ auf Basis der C-Strain Vakzine sowie im CP7-E2 α lf Kontext (REIMANN et al., 2010; KORTEKAAS et al., 2011; LEIFER et al., 2012). Das „TAVSPTTLR“-Epitop ist hochkonserviert innerhalb der CSFV, mit nur sehr wenigen Isolaten, die diese AS-Sequenz im E2 nicht enthalten. Die Region des „TAVSPTTLR“-Epitops ist hochimmunogen, was in kommerziell erhältlichen CSFV-Ab-ELISA-Systemen basierend auf der Antikörperreaktion gegen diese Region genutzt wird. Jedoch führte keine der eingeführten Veränderungen dieses Epitops bisher zu einer verlässlichen serologischen Differenzierung mit diesen verfügbaren E2-ELISA-Systemen (IDEXX CSFV Ab ELISA, IDEXX Laboratories, Shiphol-Rijk, Niederlande und Ceditest CSFV E2 ELISA, Cedi-Diagnostics, Lelystad, Niederlande)(KORTEKAAS et al., 2011; LEIFER et al., 2012). Um eine sichere Differenzierung mit diesem DIVA-Konzept gewährleisten zu können, müsste an der Verbesserung des zugehörigen Testsystems gearbeitet werden, beispielsweise über ein doppelt-kompetitives ELISA System. Das vorgeschlagene Prinzip beruht auf dem Wegfangen der spezifischen, an die Markierung angepassten Antikörper der zu untersuchenden Probe eines geimpften Tieres mit dem entsprechenden, dieselbe Markierung enthaltenden rekombinanten Protein. Nach diesem Schritt werden im E2 basierten Assay, wenn vorhanden, nur noch Wildtyp induzierte „TAVSPTTLR“-Antikörper nachgewiesen (BRUDERER et al., 2015). Die zusätzliche Kombination mit einem weiteren Marker, beispielsweise einem veränderten hochkonservierten Epitop im NS3-Protein, könnte das System noch sicherer machen. Entsprechend diesem Konzept könnte ein Doppel Check ELISA-System konzipiert werden, das auf dem serologischen Nachweis beider Immunogene beruht (CHIMENO ZOTH & TABOGA, 2006; YANG et al., 2012). Die alleinige Anwendung eines auf NS3 basierenden Marker Systems zur Detektion von CSFV Feldvirus in geimpften

Herden ist nicht indiziert, da dies auf Grund der Konservierung dieses Proteins innerhalb der Pestiviren zu falsch positiven Ergebnissen durch Detektion von Antikörpern gegen bovine Pestiviren in Seren von Schweinen führen kann (PATON et al., 1991; DE SMIT et al., 1999; VAN OIRSCHOT, 2003).

1.7. Epitopkartierung – Fahndung nach hochkonservierten AS-Sequenzen

Markierungskonzepte analog zu dem oben beschriebenen Ansatz für das „TAVSPTTLR“-Epitop bedürfen der Kenntnis um hochkonservierter Epitope. Die Forschung in Bereich der Epitopkartierung fokussierte sich in den letzten Jahren vor allem auf die Detektion immunogener Domänen und konservierter Epitope der beiden Strukturproteine E2 und E^{ns}. Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich mit dem dritten immunogenen Protein NS3. Bereits bei der Produktion monoklonaler Antikörper gegen Pestiviren vor mehr als zwei Dekaden fiel auf, dass sich unter diesen immer mAks befanden, die gegen das NS3 Protein gerichtet waren und sich gut zum Nachweis pestiviraler Infektionen eigneten (EDWARDS et al., 1988; CORAPI et al., 1990b; LECOMTE et al., 1991). Bisher konnten sowohl immunogene Domänen des NS3 und ein einzelnes BVDV-1 spezifisches Epitop definiert werden (LECOMTE et al., 1991; BROWN et al., 2002). Bei Untersuchungen der Epitoplokalisierung mehrerer mAks fiel die Region der AS 205-549, die die Helikasedomäne des Proteins enthält, als besonders immunogen auf (DEREGT et al., 2005; MAHMOODI et al., 2014). Untersuchungen von Seren BVDV-infizierter Tiere mit rekombinanten Proteinfragmenten bestätigten diese Daten und konnten zusätzlich weitere immunogene Regionen des Proteins eingrenzen (LI et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Epitop des panpesti mAks Code4 als potentiell Target für einen DIVA-Ansatz zu prüfen. Dieser mAk weist das in seiner AS-Sequenz hochkonservierte NS3-Protein in der Immunfluoreszenz und im Western Blot sicher nach. Entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte der Bereich, der für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren auf ₃₆₄HPIEEFIAP_{E373}[...]LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃ eingegrenzt werden. Diese Sequenz befindet sich in Domäne 2 der Helikase kurz nach dem Walker B Motiv (TORTORICI et al., 2015). Diese AS-Sequenz befindet sich in einem, in

verschiedenen Untersuchungen als immundominate Region definierten Abschnitt der Helikase (DEREGT et al., 2005; MAHMOODI et al., 2014).

Das Nichtstrukturprotein NS3 der Pestiviren ist ein hoch komplexes Protein, das in zwei Domänen eine Protease und eine Helikaseaktivität beinhaltet. Diese essentiellen Enzymfunktionen sind an eine geordnete Sekundär- und Tertiär-Struktur gebunden. Dafür spricht auch die hohe Konservierung der AS-Sequenz des Proteins innerhalb des Genus (HERTIG et al., 1995; XU et al., 1997). Wie essentiell die Proteinfaltung für die Zugänglichkeit des Epitops und die Bindung des mAk Code4 an die primäre Erkennungssequenz ist, zeigt sich an mehreren Stellen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Die Analysen der internen Deletionen von zwanzig AS im verkürzten sowie gesamten NS3 ergaben eine Region von insgesamt 120AS, die in beiden Immunoassays einen Einfluss auf die Detektion des Proteins mit dem mAk Code4 hatte. Wenn man davon ausgeht, dass die primäre Erkennungssequenz eines Ak meist fünf bis sieben AS umfasst, so kann man spekulieren, dass in den von Code4 nicht erkannten Proteinen die Auswirkungen der doch meisten der getesteten Deletionen auf die Faltung des exprimierten Proteins für das Ausbleiben der Bindung verantwortlich ist, wodurch sich letztlich der ausgedehnte Bereich von 120 AS als für die Bindung wichtig erweist (LI et al., 2013).

Der Fakt, das Code4 trotz Bindung eines konformationellen Epitops im Western Blot das NS3-Protein sicher detektiert, ist dennoch nicht gänzlich überraschend. Es ist bekannt, dass sich komplexe Proteine trotz Denaturierung während des Western Blots partiell rückfalten können und so auch konformationelle Epitope durch mAks detektiert werden können (DEREGT et al., 1998).

Rückblickend ergaben sich weitere Hinweise, auf die Lokalisation des Epitops im aminoterminalen Bereich der eingegrenzten 120AS aus den Ergebnissen der ersten Untersuchungen zur Eingrenzung der Lokalisation des Epitops. Im Detail anhand der Analysen der n-terminal verkürzten Proteine des pAT15 und pAT16. pAT15 kodiert für NS3 ab ₃₃₅GKIHR und enthält zusätzlich zu den AS, die in pAT16 vorhanden sind, die Region ₃₆₄HPIEEFIAPE₃₇₃[...] ₃₈₀LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃. Dieses Protein wird von Code4 detektiert und erlaubte die aminoterminaler Eingrenzung des weiter zu untersuchenden Bereichs (Abbildung 44; die Lokalisation der Epitopregion wurde in der Abbildung in grün dargestellt). pAT16 codiert für ein

verkürztes NS3 ab ₃₈₈AGLKIP und enthält somit nur noch die letzten sechs AS, die in dieser Arbeit eingegrenzten Sequenz für die NS3 Erkennung durch Code4. Das Protein enthält aber einen Großteil, insgesamt 80 der anfänglich 120 fraglichen AS, die durch interne Deletion auf Code4-Bindung überprüft wurden. Dieses Protein wurde in beiden Assays nicht durch Code4 detektiert und bestätigt, dass die stromabwärts des Epitops gelegenen AS zwar über die internen Deletionen die Bindung des mAks beeinflussen, aber nicht primär die Bindung vermitteln.

Dass die Region stromabwärts des Epitops für die Präsentation der Reste des Epitops essentiell ist, konnte auch anhand der carboxyterminalen Verkürzungen der CP7 Deletionsbibliothek (pAT12 und pAT18) gezeigt werden. Die carboxterminale Deletion in pAT12, das für NS3 bis zu VTGLK₄₉₁ sowie für 43 zusätzliche AS codiert (in Abbildung 42 in grau dargestellt), führt zu fraglichen Ergebnissen mit Code4 obwohl ₃₆₄HPIEEFIAPE₃₇₃[...]380LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃ im Protein enthalten ist. Die in der Bibliothek folgende carboxterminale Deletion des NS3-Fragments, kodiert in pAT18, endet mit der NS3 Sequenz ATGSK₅₂₆. Dieses exprimierte Protein, das von Code4 sicher detektiert wird, beinhaltet nur wenige AS des NS3 mehr und ist insgesamt kürzer als das Protein, das von pAT12 exprimiert wird (Abbildung 44). Man kann spekulieren, dass die zusätzlichen 43AS Fremdsequenz am C-terminus des pAT12-Proteins die Struktur stark beeinflussen und deshalb in diesem Kontext, obwohl die Erkennungssequenz enthalten ist, das Epitop nicht richtig auf der Oberfläche präsentiert wird. In einer Strukturanalyse im 3D-Modell zeigt sich, dass die AS Sequenz, die pAT18 von pAT12 unterscheidet (₄₉₂RMAVTVGEEQAQRRGRVGRVKPGRRYRSQETATGSK₅₂₆) sich in der Oberflächendarstellung an die für das Code4-Epitop definierenden AS angelagert ist (Daten nicht gezeigt).

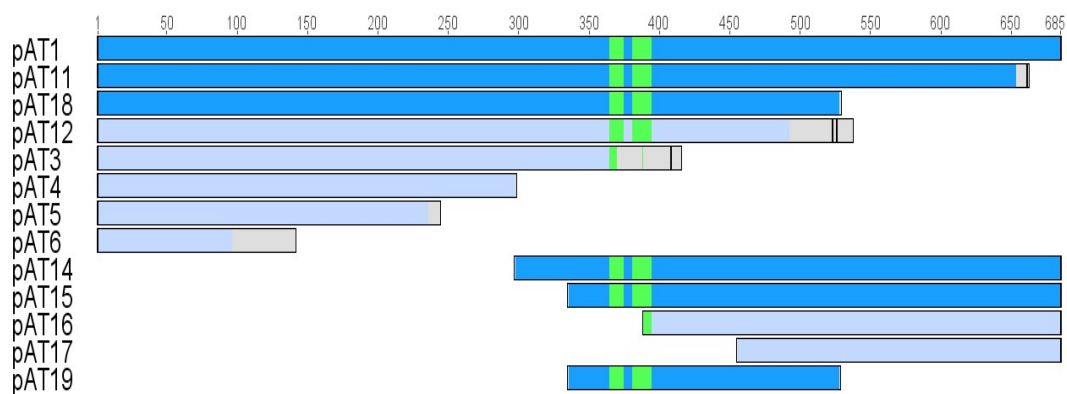


Abbildung 44: Schematische Zusammenfassung der Analysen der BVDV CP7 Deletionsfragmente in Bezug auf die Lokalisation der eingegrenzten Bindungsregion des mAKs Code4.

Die grüne Markierung entspricht der Lokalisation der als Binderegion detektierten AS-Sequenz $_{364}\text{HPIEEFIAPE}_{373}[\dots]_{380}\text{LGSQFLDIAGLKIP}_{393}$ inklusive der Unterbrechung der Erkennungssequenz. Diese entspricht den fünf die Epitopsequenz unterbrechenden AS. Die Balken entsprechen den vom Plasmid exprimierten Proteinen. Der dunklere Blauton weist auf ein positives Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse des exprimierten Proteinfragments mit Code4 hin. Ein fragliches bzw. negatives Ergebnis wird durch die hellblauen Fragmente symbolisiert. In grau sind die zusätzlichen, nicht zum NS3 gehörende AS dargestellt, die aufgrund der Plasmidkonstruktion angehängt sind. Die den NS3-Fragmenten zugehörigen Plasmidnamen sind links angegeben.

Dass die Faltung des Proteins und somit die Präsentation der Reste $_{364}\text{HPIEEFIAPE}_{373}[\dots]_{380}\text{LGSQFLDIAGLKIP}_{393}$ an der Proteinoberfläche für die Erkennung durch den mAk Code4 von Bedeutung sind, zeigt sich ebenfalls durch die Deletion der AS $_{374}\text{VMKGED}_{379}$, die der Alaninpentamersubstitution #9 entsprechen (Abbildung 29). Substituiert man diese AS mit Alanin, kann Code4 an das Epitop binden und das Protein wird in beiden Immunoassays detektiert. Proteine, die die benachbarten Alaninpentamersubstitutionen #8 und #10 enthalten, können nicht mittels Code4 nachgewiesen werden. Deletion der AS $_{374}\text{VMKGED}_{379}$ anstelle der Substitution beeinflusst die Präsentation der für die Epitopbindung erforderlichen Reste in der Art, dass es zu keiner Bindung von Code4 an das exprimierte Protein kommt. Mit diesem Experiment wurde eindeutig gezeigt, dass Code4 ein konformationelles Epitop erkennt.

Trotz der hohen Konservierung des NS3-Proteins innerhalb des Genus *Pestivirus*, haben die geringen Unterschiede der AS-Sequenz der einzelnen Viren dennoch einen Einfluss auf die Präsentation und Zugänglichkeit der für die Bindung essentiellen Reste auf der Proteinoberfläche. Dieser doch sehr überraschende Befund lässt sich an den Ergebnissen der Alaninsubstitution der Reste PE₃₇₂₋₃₇₃ sowie LG₃₈₀₋₃₈₁ zeigen. Diese Doppelsubstitutionen führten in den verschiedenen Viren trotz der überwiegenden Identität der AS-Sequenz zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für die Erkennung der BVDV-NS3-Proteine mit Code4 hat die Substitution PE₃₇₂₋₃₇₃AA einen größeren Einfluss, wobei es zwischen den Typen BVDV-1 und BVDV-2 auch einen Unterschied im Effekt dieser Substitution auf die Bindung von Code4 gibt (Abbildung 36). Im CSFV NS3 scheinen die Reste LG₃₈₀₋₃₈₁ vermehrt an der Vermittlung der Bindung von Code4 beteiligt zu sein, während die Substitution PE₃₇₂₋₃₇₃AA keinen Einfluss hat (Abbildung 36). Welchen Effekt selbst geringe Veränderungen der AS im eingegrenzten Bereich auf die Präsentation der Reste an der Oberfläche des Proteins haben, kann man anhand der strukturanalytischen Darstellung gut nachvollziehen. Veränderung der Sequenz im Bereich des vermuteten Epitops ausgehend von der CSFV NS3-Kristallstruktur hin zur CP7 NS3-Sequenz (E₃₈₃Q und F₃₈₄Y) führt zu einer Verlagerung der an der Oberfläche präsentierten Reste (Abbildung 42). Als Lokalisation der primären Bindungssequenz des mAks Code4 der verschiedenen NS3-Proteine (BVDV-1, BDVD-2 & CSFV) konnte in der vorliegenden Arbeit der Bereich ₃₆₄HPIEEFIAPE₃₇₃[...]380LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃ definiert werden. Welche Reste hauptsächlich für die Vermittlung der Bindung des BVDV-2 NS3– Code4 sowie CSFV-NS3-Code4 verantwortlich sind, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden.

1.8. Etablierung einer Code4 negativen Virusmutante

Eine weitere Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, neben der Lokalisation der primären Bindungsregion des mAks Code4 und der Identifizierung der essentiellen Reste PE₃₇₂₋₃₇₃ für BVDV CP7 ist, dass es möglich ist, die NS3-Helikase im Code4-Bindebereich durch Mutagenese zu verändern ohne größere Einschränkungen der Replikationsfähigkeit des Virus zu induzieren (Abbildung 34). In den vorangegangenen Arbeiten zur Aufklärung der immunogenen

Regionen und Epitope des NS3-Proteins wurden bereits andere konservierte Regionen bestimmt (DEREGT et al., 2005; LI et al., 2013). Ob Veränderungen an diesen Regionen vom Virus toleriert werden und so als potentiell Markerkonzept in einer DIVA-MLV anwendbar wären, wurde in den Arbeiten nicht untersucht

Aufgrund der komplexen Sekundär- und Tertiärstruktur, die für die essentiellen enzymatischen Funktionen des NS3 vonnöten sind, toleriert das Protein besonders im Bereich der Helikase-Domäne Veränderungen nur in sehr geringem Maße. Die Doppelalaninsubstitution PE₃₇₂₋₃₇₃AA wurde in einer replikationsfähigen CP7-Mutante ohne Einschränkung toleriert. Die eingeführte Veränderung war nach vier Passagen stabil nachzuweisen. In wieweit sich weitere Veränderungen im Bereich der Helikase einbringen lassen, ist eine Fragestellung, die in anschliessenden Untersuchungen aufgeklärt werden muss. Eine weitere offene Frage ist, ob sich das Prinzip der Markierung für die Anwendung im Tier zur Unterscheidung von Impfstoff assoziierten oder feldvirusinduzierten Antikörpern etablieren lässt. Aus Untersuchungen von Seren von BVDV bzw. CSFV infizierten Tieren ergaben sich Hinweise auf die Induktion von Antikörpern im Tier gegen diesen Bereich (Animal and Plant and Health Agency (APHA), unveröffentlichte Daten).

Auf dem Markt sind verschiedene, auf die Detektion von NS3-Antikörpern ausgelegte ELISA-Systeme erhältlich. Auf welchem mAk die Detektion des jeweiligen Tests beruht, ist nicht für alle Systeme bekannt. Aufgrund der hohen Immunogenität der hochkonservierten Region wäre es möglich, dass eines der Testsysteme auf dem Nachweis von Antikörpern gegen die hier identifizierte Region beruht. Dies könnte in weiterführenden Experimenten überprüft werden. Sollte dies nicht der Fall sein, müsste ein auf die Markierung abgestimmter ELISA entwickelt werden. Die bereits etablierten Systeme zur Detektion von Antikörpern gegen NS3 bieten hierfür aber eine gute Basis. Dies sind Aufgabenstellungen, die für die weitere Etablierung eines auf Code4 basierenden DIVA-Konzeptes angegangen werden müssen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit das Epitopes des mAk Code4 auf den Bereich ₃₆₄HPIEEFIAPE₃₇₃[...] ₃₈₀LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃ eingrenzt werden. Basierend auf der Veränderung PE₃₇₂₋₃₇₃AA konnte eine Code4-negative

BVD Virusmutante etabliert werden, die die eingeführte Veränderung während Passagen beibehielt und keinen signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber dem Ausgangsvirus in Zellkultur aufwies. Die Ergebnisse zeigen, dass die Helikaseregion des NS3 ein hochkonserviertes Epitop enthält, das sich ohne Einschränkung der Replikationsfähigkeit des Virus verändern lässt, so dass das translatierte NS3 nicht mehr vom eingesetzten mAk Code4 erkannt werden kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

BVDV und CSFV zählen zum Genus *Pestivirus*, das ausschließlich tierpathogene Erreger beinhaltet. Diese Pathogene verursachen in landwirtschaftlichen Nutztieren Infektionskrankheiten, die zu enormen wirtschaftlichen Verlusten führen. Um diese Schäden besser eindämmen und die Krankheiten erfolgreich bekämpfen zu können, ist es erforderlich moderne, verbesserte Vakzinen zu entwickeln. Um eine Basis für solche neuen Vakzinestrategien zu schaffen, wurde viel in die Forschung investiert, um die Molekularbiologie der Pestiviren aufzuklären. Wichtige Ziele dieser Forschung sind ein verbessertes Verständnis der Funktionsweisen essentieller, viraler Proteine und die Identifizierung hochkonservierter Epitope als Ausgangspunkt zur Entwicklung sicherer und effizienter Markerimpfstoffe.

Der Dimerisierung des E^{ns} wurde bereits eine Funktion als Virulenzfaktor der Pestiviren zugeschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Relevanz der E^{ns}-Dimere für die Virulenz von CSFV durch Analyse einer Pseudorevertante mit restaurierter Fähigkeit zur Dimerisierung näher zu untersuchen. Aufbauend auf Ergebnissen vorangegangener Arbeiten wurden Pathogenitätsstudien im natürlichen Wirt durchgeführt. In diesen wurde die Pathogenese ausgelöst durch die Pseudorevertante (C₁₇₁S/S₂₀₉C), die über das Cystein an Position 209 anstelle des ursprünglichen Cysteins 171 kovalent verbundenen Dimere bilden kann, mit der parental attenuierten, dimerisierungsnegativen CSFV-Mutante (C₁₇₁S) und dem Wildtypvirus CSFV Alfort/Tübingen verglichen und charakterisiert. Die Experimente bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Studien und zeigten, dass die Attenuierung des dimerisierungsnegativen Virus (C₁₇₁S) durch Pseudoreversion (C₁₇₁S/S₂₀₉C) partiell aufgehoben werden kann. Somit konnte der Zusammenhang zwischen der Virulenz des CSFV und der E^{ns}-Dimerbildung auch positiv belegt werden.

Das Wissen um hoch immunogene Regionen und definierte Epitope der Antikörper-induzierenden Proteine von Viren könnte zur Entwicklung von DIVA-Strategien für Impfstoffe genutzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Lokalisation des hochkonservierten Epitops, das vom panpesti mAk Code4

erkannt wird, im Nichtstrukturprotein NS3 kartiert. Die Antikörperbindungsstelle konnte auf den Bereich $_{364}\text{HPIEEFIAPE}_{373}[\dots]_{380}\text{LGSQFLDIAGLKIP}_{393}$ eingrenzt werden. Zur Überprüfung, ob eine Veränderung dieser Region des für die Replikation essentiellen Proteins vom Virus toleriert wird, wurde eine Code4-negative BVD-Virusmutante mit der Mutation $\text{PE}_{372-373}\text{AA}$ etabliert. Die Virusmutante erwies sich in Passagen als stabil und zeigte keine deutliche Einschränkung der Replikationsfähigkeit. Das von diesem Virus exprimierte NS3-Potein wurde vom mAk Code4 nicht erkannt. Veränderungen an diesem Epitop könnten somit Anwendung als Negativmarkierung im Sinne des DIVA-Konzeptes finden.

VII. SUMMARY

BVDV and CSFV belong to genus *Pestivirus*, a group of pathogens comprising solely animal viruses. These viruses induce infectious diseases of livestock, which lead to enormous economic losses. To counteract to these losses and fight the diseases, improved modern vaccines have to be developed. In order to provide a basis for novel vaccine approaches, a lot of research was done to come to a better understanding of the molecular biology of pestiviruses. Important aims of this work were to gain detailed knowledge of functional principles of essential proteins as well as to identify highly conserved epitopes as starting point for the development of modern, safe and efficient marker vaccines.

A function as virulence determinant was already proposed for the dimerization of the structural protein E^{ns}. The objective of the present work was to confirm the impact of E^{ns} dimers for CSFV virulence through analysis of pseudorevertants with restored ability to form E^{ns} dimers. Based on the results of previous experiments two studies were conducted to define the pathogenicity of such pseudorevertants in the natural host. The clinical outcome of a pseudorevertant virus (C₁₇₁S/S₂₀₉C), a mutant in which the formation of covalently linked homodimers was reestablished through the Cysteine at position 209 instead of the original Cysteine 171, was compared to the parental attenuated, dimerization negative virus (C₁₇₁S) and the wild type virus. The studies confirmed the results of the former experiments and indicated that the attenuation of the dimer-negative virus can be partially abolished through the observed pseudoreversion. Thus, the direct link between CSFV virulence and E^{ns} dimer formation could be proven.

The knowledge of highly immunogenic regions as well as defined epitopes of immunodominant proteins can be used to develop DIVA strategies for viral vaccines. Therefore, the aim of the second part of this thesis was to map the localization of a highly conserved epitope of the non-structural protein NS3 recognized by the panpesti mAb Code4. The binding region could be narrowed down to aa ₃₆₄HPIEEFIAPE₃₇₃[...]LGSQFLDIAGLKIP₃₉₃. To validate if a mutation of the essential protein could be tolerated by the virus, a Code4 negative BVD

mutant was established by introducing the mutation PE₃₇₂₋₃₇₃AA. This exchange was found to be stable during passages of the recovered virus, which did also not show significant impairment of its replication efficiency. The NS3 protein expressed by the mutant was not detected by the mAb Code4, providing proof of principle that a negative marker DIVA concept could be implemented based on changes affecting the mapped epitope.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aberle D, Muhle-Goll C, Bürck J, Wolf M, Reisser S, Luy B, Wenzel W, Ulrich AS, Meyers G. Structure of the membrane anchor of pestivirus glycoprotein E(rns), a long tilted amphipathic helix. PLoS Pathog 2014; 10: e1003973.

Agapov EV, Frolov I, Lindenbach BD, Pragai BM, Schlesinger S, Rice CM. Noncytopathic sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 12989-94.

Ansari IH, Chen LM, Liang D, Gil LH, Zhong W, Donis RO. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. J.Virol. 2004; 78: 9612-23.

Armengol E, Wiesmüller KH, Wienhold D, Büttner M, Pfaff E, Jung G, Saalmüller A. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. J Gen Virol 2002; 83: 551-60.

Baker JC. Bovine viral diarrhea virus: A review. J.Am.Vet.Med.Assoc. 1987; 190: 1449-58.

Barkema HW, Bartels CJ, van Wuijckhuise L, Hesselink JW, Holzhauer M, Weber MF, Franken P, Kock PA, Bruschke CJ, Zimmer GM. Outbreak of bovine virus diarrhea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhea virus type 2. Tijdschr. Diergeneeskd. 2001; 126: 158-65.

Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, Tratschin JD, Hofmann MA, Ruggli N. Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. J.Virol. 2007; 81: 3087-96.

Beer M, Reimann I, Hoffmann B, Depner K. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 2007; 25: 5665-70.

Beer M, Goller KV, Staubach C, Blome S. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. *Anim. Health. Res. Rev* 2015; 16: 33-9.

Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 1998; 72: 2364-72.

Bekal S, Domier LL, Gonfa B, McCoppin NK, Lambert KN, Bhalerao K. A novel flavivirus in the soybean cyst nematode. *J Gen Virol* 2014; 95: 1272-80.

Bhatia S, Sood R, Mishra NB, Pattnaik B, Pradhan HK. Development and evaluation of a MAbs based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhoea in cattle and buffaloes. *Res. Vet. Sci.* 2007; 85: 39-45.

Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet.Microbiol.* 2003; 96: 337-44.

Brown LM, Papa RA, Frost MJ, Mackintosh SG, Gu X, Dixon RJ, Shannon AD. A single amino acid is critical for the expression of B-cell epitopes on the helicase domain of the pestivirus NS3 protein. *Virus Res* 2002; 84: 111-24.

Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res.Vet.Sci.* 1989; 46: 307-11.

Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 2015; 33: 257-90.

Bruderer U, van de Velde J, Frantzen I, De Bortoli F. Discrimination within epitope specific antibody populations against Classical swine fever virus is a new means of differentiating infection from vaccination. *J. Immunol. Methods.* 2015; 420: 18-23.

Brun A. Vaccines and Vaccination for Veterinary Viral Diseases: A General Overview. In: *Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases.* Brun A, ed. New York: Springer Science + Business Media 2016: 1-22.

Bruschke CJ, Moormann RJ, van Oirschot JT, van Rijn PA. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine* 1997; 15: 1940-5.

Burrack S, Aberle D, Bürck J, Ulrich AS, Meyers G. A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein. *FASEB J* 2012; 26: 3292-305.

Casaro AP, Kendrick JW, Kennedy PC. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am.J.Vet.Res.* 1971; 32: 1543-62.

Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J.Gen.Virol.* 2001; 82: 1893-7.

Chase CC. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals* 2013; 41: 52-60.

Chimeno Zoth S, Taboga O. Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. *J. Virol. Methods.* 2006; 138: 99-108.

Christmann A, Wentzel A, Meyer C, Meyers G, Kolmar H. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries. J.Immunol.Methods 2001; 257: 163-73.

Coggins L, Gillespie JH, Robson DS, Thompson JD, Phillips WV, Wagner WC, Baker JA. Attenuation of virus diarrhea virus (strain Oregon C24 V) for vaccine purposes. The Cornell Veterinarian 1961; 51: 539-45.

Collett MS, Wiskerchen MA, Welniak E, Belzer SK. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. Arch.Virol.Suppl 1991; 3: 19-27.

Corapi WV, French TW, Dubovi EJ. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. J Virol 1989; 63: 3934-43.

Corapi WV, Elliott RD, French TW, Dubovi EJ. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc 1990a; 196: 590-6.

Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. Am J Vet Res 1990b; 51: 1388-94.

Darweesh MF, Rajput MK, Braun LJ, Ridpath JF, Neill JD, Chase CC. Characterization of the cytopathic BVDV strains isolated from 13 mucosal disease cases arising in a cattle herd. Virus. Res. 2015; 195: 141-7.

de Smit AJ, Eblé PL, de Kluijver EP, Bloemraad M, Bouma A. Laboratory decision-making during the classical swine fever epidemic of 1997-1998 in The Netherlands. Prev. Vet. Med. 1999; 42: 185-99.

Deregt D, Bolin SR, van den Hurk J, Ridpath JF, Gilbert SA. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus. Res.* 1998; 53: 81-90.

Deregt D, Dubovi EJ, Jolley ME, Nguyen P, Burton KM, Gilbert SA. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 2005; 108: 13-22.

Deutskens F, Lamp B, Riedel CM, Wentz E, Lochnit G, Doll K, Thiel HJ, Rümenapf T. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet. Res.* 2011; 42

Dong XN, Qi Y, Ying J, Chen X, Chen YH. Candidate peptide-vaccine induced potent protection against CSFV and identified a principal sequential neutralizing determinant on E2. *Vaccine* 2006; 24: 426-34.

Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 2007; 25: 205-30.

Dunne HW. Hog cholera (European swine fever). *Adv Vet Sci Comp Med* 1973; 17: 315-59.

Edwards S, J.J. S, Harkness JW. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.* 1988; 102: 197-206.

Elbers K, Tautz N, Becher P, Rümenapf T, Thiel HJ. Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol* 1996; 70: 4131-5.

Engels H (2015) BVD: wo steht Deutschland? Interview zum Schutz vor Boviner Diarrhoe. In: Agrarmanager. Deutscher Landwirtschaftsverlag. 70-1

Fernandez-Sainz I, Holinka LG, Gavrilov BK, Prarat MV, Gladue D, Lu Z, Jia W, Risatti GR, Borca MV. Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology* 2009; 386: 210-216.

Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Python S, Summerfield A, Ruggli N. Classical Swine Fever virus npro limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7. *J.Virol.* 2011; 85: 8002-11.

Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, Conte JM, Ng J, Garcia J, Bhuva NP, Lee B, Che X, Quan PL, Lipkin WI. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio* 2014; 5: e01933-14.

Floegel-Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet. Microbiol.* 2001; 83: 121-36.

Gamlen T, Richards KH, Mankouri J, Hudson L, McCauley J, Harris M, Macdonald A. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J.Gen.Virol.* 2010; 91: 133-44.

Gladue DP, Holinka LG, Fernandez-Sainz IJ, Prarat MV, O'Donnell V, Vepkhvadze N, Lu Z, Rogers K, Risatti GR, Borca MV. Effects of the interactions of classical swine fever virus Core protein with proteins of the SUMOylation pathway on virulence in swine. *Virology* 2010; 407: 129-36.

Gladue DP, Holinka LG, Fernandez-Sainz IJ, Prarat MV, O'Donnell V, Vepkhvadze NG, Lu Z, Risatti GR, Borca MV. Interaction between Core protein of classical

swine fever virus with cellular IQGAP1 protein appears essential for virulence in swine. *Virology* 2011; 412: 68-74.

Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett* 2003; 552: 28-34.

Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3889-97.

Grassmann CW, Isken O, Behrens SE. Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study. *J Virol* 1999; 73: 9196-205.

Grassmann CW, Isken O, Tautz N, Behrens SE. Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol* 2001; 75: 7791-802.

Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004; 85: 451-61.

Gu B, Liu C, Lin-Goerke J, Maley DR, Gutshall LL, Feltenberger CA, Del Vecchio AM. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol* 2000; 74: 1794-800.

Hansen TR, Smirnova NP, Webb BT, Bielefeldt-Ohmann H, Sacco RE, Van Campen H. Innate and adaptive immune responses to in utero infection with bovine viral diarrhea virus. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16: 15-26.

Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 2000; 74: 9498-506.

Heimann M, Roman-Sosa G, Martoglio B, Thiel HJ, Rümenapf T. Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J. Virol.* 2006; 80: 1915-21.

Henderson LM. Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals* 2005; 33: 203-9.

Hertig C, Stalder H, Peterhans E. Genetic heterogeneity within the coding regions of E2 and NS3 in strains of bovine viral diarrhea virus. *Gene* 1995; 153: 191-5.

Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods.* 2005; 130: 36-44.

Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods.* 2006; 136: 200-209.

Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, Moormann RJ. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.* 1993; 67: 5435-42.

Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* 1997; 78 (Pt 11): 2779-87.

Hulst MM, van Gennip HG, Moormann RJ. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate

due to a single amino acid change in envelope protein E(rns). J.Virol. 2000; 74: 9553-61.

Hulst MM, Moormann RJ. Erns protein of pestiviruses. Methods Enzymol. 2001; 342: 431-40.

Hulst MM, van Gennip HG, Vlot AC, Schooten E, de Smit AJ, Moormann RJ. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. J.Virol. 2001; 75: 9585-95.

Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. J.Virol. 2004; 78: 136-45.

Ishikawa K, Nagai H, Katayama K, Tsutsui M, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama MS, A. , Takagi M, Gotoh K. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. Arch. Virol. 1995; 140: 1385-91.

Isken O, Langerwisch U, Schönherr R, Lamp B, Schröder K, Duden R, Rümenapf TH, Tautz N. Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. J Virol 2014; 88: 82-98.

Ivanyi-Nagy R, Lavergne JP, Gabus C, Ficheux D, Darlix JL. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. Nucleic Acids Res 2008; 36: 712-25.

Jenckel M, Höper D, Schirrmeier H, Reimann I, Goller KV, Hoffmann B, Beer M. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhea virus detected by deep sequencing. J Virol 2014; 88: 6983-92.

Kawai A, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 131-7.

Kim JS, Soucek J, Matousek J, Raines RT. Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 1995a; 270: 10525-30.

Kim JS, Soucek J, Matousek J, Raines RT. Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1995b; 270: 31097-102.

Klimstra WB, Ryman KD, Johnston RE. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* 1998; 72: 7357-66.

Koenig P, Lange E, Reimann I, Beer M. CP7_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* 2007; 25: 3391-9.

Kortekaas J, Ketelaar J, Vloet RP, Loeffen WL. Protective efficacy of a Classical swine fever virus C-strain deletion mutant and ability to differentiate infected from vaccinated animals. *Vet. Microbiol.* 2011; 147: 11-8.

Kramps JA, van Maanen C, van de Wetering G, Stienstra G, Quak S, Brinkhof J, Rønsholt L, Nylin B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet. Microbiol.* 1999; 64: 1356-144.

Krey T, Bontems F, Vonnrhein C, Vaney MC, Bricogne G, Rümenapf T, Rey FA. Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E(rns) and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. *Structure* 2012; 20: 862-73.

Lackner T, Müller A, Pankraz A, Becher P, Thiel HJ, Gorbalenya AE, Tautz N. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J.Virol.* 2004; 78: 10765-75.

Lackner T, Müller A, König M, Thiel HJ, Tautz N. Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J.Virol.* 2005; 79: 9746-55.

Lamp B, Riedel C, Roman-Sosa G, Heimann M, Jacobi S, Becher P, Thiel HJ, Rümenapf T. Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins. *J.Virol.* 2011; 85: 3607-20.

Langedijk JP, van Veelen PA, Schaaper WM, de Ru AH, Meloen RH, Hulst MM. A structural model of pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J.Virol.* 2002; 76: 10383-92.

Lecomte C, Vandenberghe D, Vanderheijden N, De Moerloose L, Pin JJ, Chappuis G, Desmettre P, Renard A. Identification and production of pestivirus proteins for diagnostic and vaccination purposes. *Arch. Virol. Suppl.* 1991; 3: 149-56.

Lee JE, Raines RT. Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer. *Biochemistry.* 2005; 44: 15760-7.

Leifer I, Lange E, Reimann I, Blome S, Juanola S, Duran JP, Beer M. Modified live marker vaccine candidate CP7_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine* 2009;

Leifer I, Blome S, Blohm U, König P, Kuster H, Lange B, Beer M. Characterization of C-strain "Riems" TAV-epitope escape variants obtained through selective antibody pressure in cell culture. *Vet Res* 2012; 43: 33.

Leifer I, Ruggli N, Blome S. Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence. *Virology* 2013; 438: 51-5.

Li Y, Jia Y, Wen K, Liu H, Gao M, Ma B, Zhang W, Wang J. Mapping B-cell linear epitopes of NS3 protein of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 151: 331-6.

Liang D, Chen L, Ansari IH, Gil LH, Topliff CL, Kelling CL, Donis RO. A replicon trans-packaging system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhea virus (BVDV) virion. *Virology* 2009; 387: 331-40.

Liess B, Orban S, Frey HR, Trautwein G, Weifel W, Blindow H. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVDV virus 90-220 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 1984; 31: 669-81.

Lin M, Lin F, Mallory M, Clavijo A. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J.Virol.* 2000; 74: 11619-25.

Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In: *Fields Virology* Knipe DM, Howley PM, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2013: 712-46.

Liu JJ, Wong ML, Chang TJ. The recombinant nucleocapsid protein of classical swine fever virus can act as a transcriptional regulator. *Virus Res* 1998; 53: 75-80.

Magkouras I, Mätzener P, Rümenapf T, Peterhans E, Schweizer M. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J.Gen.Virol.* 2008; 89: 2501-6.

Mahmoodi P, Shapouri MR, Ghorbanpour M, Ekhtelat M, Hajikolaei MR, Lotfi M, Boroujeni MP, Daghari M. Epitope mapping of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 3. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2014; 161: 232-9.

Makoschey B, Sonnemans D, Bielsa JM, Franken P, Mars M, Santos L, Alvarez M. Evaluation of the induction of NS3 specific BVDV antibodies using a commercial inactivated BVDV vaccine in immunization and challenge trials. *Vaccine* 2007; 25: 6140–5.

Mätzener P, Magkouras I, Rümenapf T, Peterhans E, Schweizer M. The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Res.* 2009; 140: 15-23.

Mayer D, Thayer TM, Hofmann MA, Tratschin JD. Establishment and characterisation of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent. *Virus Res.* 2003; 98: 105-16.

Mayer D, Hofmann MA, Tratschin JD. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene. *Vaccine* 2004; 22: 317-28.

Meyer C, Von Freyburg M, Elbers K, Meyers G. Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J.Virol.* 2002; 76: 8494-503.

Meyer H, Liess B, Frey HR, Hermanns W, Trautwein G. Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets. *Zentralbl Veterinarmed B* 1981; 28: 659-68.

Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, Thiel HJ. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 1992; 191: 368-86.

Meyers G, Saalmüller A, Büttner M. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* 1999; 73: 10224-35.

Meyers G, Ege A, Fetzner C, von FM, Elbers K, Carr V, Prentice H, Charleston B, Schürmann EM. Bovine viral diarrhoea virus: Prevention of persistent foetal infection by a combination of two mutations affecting the Erns RNase and the Npro protease. *J.Virol.* 2007; 0: 02372-06.

Mittelholzer C, Moser C, Tratschin JD, Hofmann MA. Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet.Microbiol.* 2000; 74: 293-308.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Flaviviren. In: *Molekulare Virologie*: 2010:

Moennig V, Greiser-Wilke I (2008) Classical Swine Fever Virus. In: *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Oxford. 525-32

Moennig V, Becher P. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? *Anim. Health. Res. Rev.* 2015; 16: 83-7.

Moulin HR, Seuberlich T, Bauhofer O, Bennett LC, Tratschin JD, Hofmann MA, Ruggli N. Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* 2007; 365: 376-89.

Murray CL, Marcotrigiano J, Rice CM. Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J.Virol.* 2008; 82: 1294-304.

Paton DJ, Lowings JP, Barrett ADT. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virology* 1990; 190: 763-72.

Paton DJ, Ibata G, Edwards S, Wensvoort G. An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. *J Virol Methods*. 1991; 31: 315-24.

Ramsey FK, Chivers WH. Mucosal disease of cattle. *Nort. Am. Vet.* 1953: 629-33.

Rau H, Revets H, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. Immunological properties of recombinant classical swine fever virus NS3 protein in vitro and in vivo. *Vet. Res.* 2006; 37: 155-68.

Raue R, Harmeyer SS, Nanjiani IA. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Vet. J.* 2011; 187: 330-4.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: D343-50.

Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998; 72: 6199-206.

Reimann I, Depner K, Utke K, Leifer I, Lange E, Beer M. Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Vet Microbiol* 2010; 142: 45-50.

Ridpath J. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 105-21.

Ridpath JF. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* 2013; 41: 14-9.

Riedel C, Lamp B, Heimann M, König M, Blome S, Moennig V, Schuttler C, Thiel HJ, Rümenapf T. The core protein of classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro. PLoS Pathog 2012; 8: e1002598.

Risatti GR, Borca MV, Kutish GF, Lu Z, Holinka LG, French RA, Tulman ER, Rock DL. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. J.Virol. 2005a; 79: 3787-96.

Risatti GR, Holinka LG, Lu Z, Kutish GF, Tulman ER, French RA, Sur JH, Rock DL, Borca MV. Mutation of E1 glycoprotein of classical swine fever virus affects viral virulence in swine. Virology 2005b; 343: 116-27.

Risatti GR, Holinka LG, Carrillo C, Kutish GF, Lu Z, Tulman ER, Sainz IF, Borca MV. Identification of a novel virulence determinant within the E2 structural glycoprotein of classical swine fever virus. Virology 2006; 355: 94-101.

Risatti GR, Holinka LG, Fernandez SI, Carrillo C, Lu Z, Borca MV. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine. J.Virol. 2007; 81: 924-33.

Ruggli N, Summerfield A, Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Bauhofer O, Lamm CG, Waltersperger S, Matsuno K, Liu L, Gerber M, Choi KH, Hofmann MA, Sakoda Y, Tratschin JD. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of Npro. J.Virol. 2009; 83: 817-29.

Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. J Virol 1993; 67: 3288-95.

Rümenapf T, Thiel H-J. Molecular Biology of Pestiviruses. In: Animal Viruses: Molecular Biology. Mettenleiter TC, Sobrino F, eds. Norfolk, UK: Caister Academic Press 2014: 39-96.

Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, Rodarte R, Tanuri A, Mason PW. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* 1997; 71: 5115-23.

Sainz IF, Holinka LG, Lu Z, Risatti GR, Borca MV. Removal of a N-linked glycosylation site of classical swine fever virus strain Brescia Erns glycoprotein affects virulence in swine. *Virology* 2008; 370: 122-9.

Schürmann E-M (2010) Viren der Bovinen Virusdiarrhoe und der Klassischen Schweinepest - Einfluss von Mutationen auf Persistenzentwicklung, Virulenz und Induktion einer Interferonantwort. In: Fachbereich Veterinärmedizin. Justus-Liebig-Universität, Giessen

Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM, Stiasny K, Thiel HJ, Weiner A, Bukh J. Flaviviridae. In: 3. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, Fauquet CM, eds. San Diego, USA: Academic Press 2012: 1003-20.

Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB. Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry* 2007; 76

Smirnova NP, Webb BT, Bielefeldt-Ohmann H, Van Campen H, Antoniazzi AQ, Morarie SE, Hansen TR. Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Virus Res* 2012; 167: 329-36.

Smirnova NP, Webb BT, McGill JL, Schaut RG, Bielefeldt-Ohmann H, Van Campen H, Sacco RE, Hansen TR. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Virus Res* 2014; 183: 95-106.

Tamura T, Sakoda Y, Yoshino F, Nomura T, Yamamoto N, Sato Y, Okamatsu M, Ruggli N, Kida H. Selection of classical swine fever virus with enhanced pathogenicity reveals synergistic virulence determinants in E2 and NS4B. *J Virol* 2012; 86: 8602-13.

Tamura T, Nagashima N, Ruggli N, Summerfield A, Kida H, Sakoda Y. Npro of classical swine fever virus contributes to pathogenicity in pigs by preventing type I interferon induction at local replication sites. *Vet Res* 2014; 45: 47.

Tautz N, Kaiser A, Thiel HJ. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 2000; 273: 351-63.

Tautz N, Tews BA, Meyers G. The Molecular Biology of Pestiviruses. In: *Adv Virus Res*: 2015: 47-160.

Tews BA, Schürmann EM, Meyers G. Mutation of cysteine 171 of pestivirus E rns RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J.Virol.* 2009; 83: 4823-34.

Tortorici MA, Duquerroy S, Kwok J, Vonnrhein C, Perez J, Lamp B, Bricogne G, Rümenapf T, Vachette P, Rey FA. X-ray structure of the pestivirus NS3 helicase and its conformation in solution. *J. Virol.* 2015; 89: 4356-71.

Uttenthal A, Le Potier MF, Romero L, De Mia GM, Floegel-Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet Microbiol* 2001; 83: 85-106.

van Gennip HG, Vlot AC, Hulst MM, de Smit AJ, Moormann RJ. Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia. *J.Virol.* 2004; 78: 8812-23.

van Gennip HG, Hesselink AT, Moormann RJ, Hulst MM. Dimerization of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus is not essential for viral replication and infection. Arch.Virol. 2005; 150: 2271-86.

Van Oirschot JT. Experimental production of congenital persistent swine fever infections: I. Clinical, pathological and virological observations. Veterinary Microbiology 1979; 4: 117-32.

van Oirschot JT. Hog Cholera. In: Disease of swine. al Le, ed. Ames IA: Iowa State University Press 1992: 274-85.

van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. J Biotechnol 1999; 73: 195-205.

van Oirschot JT. Present and future of veterinary viral vaccinology: A review. Veterinary Quarterly 2001; 23: 100-8.

van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. Vet Microbiol 2003; 96: 367-84.

van Rijn PA, Miedema GKW, Wensvoort G, van Gennip HGP, Moormann RJM. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. J Virol 1994; 68: 3934-42.

Vannier P, Capua I, Le Potier MF, Mackay DK, B. M, Parida S, Paton DJ, Thiry E. Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. Rev. Sci. Tech. 2007; 26: 351-72.

Warrener P, Collett MS. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. J Virol 1995; 69: 1720-6.

Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, Thiel HJ. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* 1992; 66: 3677-82.

Wensvoort G, Terpstra C. [Swine fever: a changing clinical picture]. *Tijdschr Diergeneeskde* 1985; 110: 263-9.

Wirtz (2013) Gezielte Attenuierung und Markierung von Viren der klassischen Schweinepest durch Mutation - Ansätze zur Entwicklung einer neuartigen Vakzine gegen das Virus der klassischen Schweinepest zur Differenzierung infizierter von vakzinierten Tieren. In: 3689

Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001087.

Wu Z, Wang Q, Feng Q, Liu Y, Teng J, Yu AC, Chen J. Correlation of the virulence of CSFV with evolutionary patterns of E2 glycoprotein. *Front. Biosci.* 2010; (Elite Ed) 2: 204-20.

Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, Zhang J, Dong J, Sun L, Du J, Liu L, Xue Y, Wang J, Yang F, Zhang S, Jin Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol* 2012; 86: 10999-1012.

Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* 1997; 71: 5312-22.

Yang ZH, Li L, Pan ZS. Development of multiple elisas for the detection of antibodies against classical swine fever virus in pig sera. *Virologica Sinica* 2012; 27: 48-56.

Young NJ, Thomas CJ, Thompson I, M.E. C, Brownlie J. Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72: 115-20.

Zhang F, Yu M, Weiland E, Morrissy C, Zhang N, Westbury H, Wang LF. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library. *Arch. Virol.* 2006; 151: 37-54.

IX. ANHANG

1. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A	Alanin (Ala)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BDV	border disease virus
bidest.	bidestilliertes H ₂ O
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BVD	Bovine virale Diarrhoe
BVDV	Bovines Virales Diarrhoe Virus
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein (Cys)
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cp	zytopathogen
cpe	zytopathogener Effekt
CSFV	Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	didesoxy
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIVA	“differentiation between infected and vaccinated animals”
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	"days post infection"
ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli

E2	Strukturprotein E2
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraessigsäure
EMCV	Encephalomyocarditis virus
EP	Elektroporation
E ^{rns}	Strukturprotein E ^{rns}
et al.	et aliter (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
IC2-RNA	interne Extraktionskontrolle
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
INF	Interferon
IRES	"internal ribosomal entry side"
IRF	Interferon regulierender Faktor
ISG	Interferon stimulierten Gene
JIV	"J domain protein interacting with viral protein"
k	Kilo
K	Lysin (Lys)
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KID	Kulturinfektiöse Dosis
L	Leucin (Leu)
l	Liter
LB	Luria Bertrani
log	Logstufe
m	Meter
m	milli
M	molar (mol/l)
mAb	"monoclonal Antibody"
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	mucosal disease
Medium(+)	Medium mit FCS
min	Minute
mM	millimolar
MOI	"multiplicity of infection"

Mol	molar
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
n	nano-
n.d.	nicht durchgeführt
NaAc	Natriumacetat
NC	Nitrocellulose
ncp	nicht zythopathogen
NS3	Nichtstrukturprotein 3
NSP	Nichtstrukturprotein
NTC	"no template control" (negativ Kontrolle)
N-terminal	aminoterminal
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
NTPase	nucleoside-triphosphatase
NTR	nicht translatierte Region
OD600	optische Dichte bei 600 nm
OIE	"World Organisation for Animal Health"
ORF	"open reading frame"
p	pico-
P	Prolin (Pro)
p.a.	pro analysi
pamp	"pathogen-associated molecular pattern"
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pi	"post infection"
PI	persistent infiziert
pr	"pattern recognition receptor"
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin (Gln)
QC-PCR	Quik Change®-PCR
R	Arginin (Arg)
real-time RT-PCR	real-time Reverse Transkriptase PCR
RIC	RNA Isolierungskontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rns	ribonuclease secreted
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
S	Serin (Ser)
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	„standard deviation“

SDS	Sodium (Natrium) dodecyl-sulfate
sec	Sekunden
SNT	Serumneutralisationstest
SP	Strukturprotein
Spase	Signal Peptidase
ss	einzelsträngig
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SSPase	Peptid Peptidase
T	Threonin (Thr)
T	Thimidin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAV-Epitop	TAVSPTTLRT Epitop auf dem E2 Protein von CSFV (AS 140-149 E2)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
Temp.	Temperatur
TF	Transfektion
TLR	„toll like receptor“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TV	Tierversuch
U	Aktivitätseinheit (Enzyme)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Valin (Val)
V	Volt
V	Valin (Val)
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen %
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ	Mikro-

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundlegende Eigenschaften der Pestiviren aus TAUTZ et al. (2015).	14
Abbildung 2: Lokalisation des E ^{rn} s im Viruspartikel sowie seine Struktur (Abbildung aus TAUTZ et al. (2015)).....	18
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung eines NS3-Expressionsplasmids anhand pAT1.....	45
Abbildung 4: Wachstumskinetik der eingesetzten Viren EP 82/2 (7.Passage), 1990CIII (5.Passage) und 1347 RTFIII (4.Passage) in SK6 Zellen....	86
Abbildung 5: Klinische Punktzahlen der Gruppen 1-3 im Versuchsverlauf.	91
Abbildung 6 : Körpertemperaturen der Tiere im Verlauf des Versuchs.	92
Abbildung 7: Gesamtleukozytenzahlen.	94
Abbildung 8: Ergebnisse der real-time RT-PCR im Gruppenkontext mit Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markierte den negativen Bereich > 40.	96
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Serumneutralisationstests TV#61/13.	99
Abbildung 10: Ergebnisse des CSFV ELISA. Serum (S) und Plasma (PL) der Tiere wurden mittels IDEXX CSFV Ab ELISA getestet.....	100
Abbildung 11: Wachstumskinetik der in TV#2/15 eingesetzten Viruspräparation mit Standardabweichung.	102
Abbildung 12: klinische Punktzahlen der Gruppen 1-3 TV#02/15.....	107
Abbildung 13: Körpertemperaturen der Tiere im Verlauf des Versuchs. (A-C) Körpertemperaturen der Einzeltiere nach Gruppen getrennt.	109
Abbildung 14: Leukozytenzahlen.	110
Abbildung 15: Ergebnisse der real time RT-PCR im Gruppenkontext mit Standardabweichung.....	113
Abbildung 16: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Serumneutralisationstests zum TV#02/15.	116
Abbildung 17: Ergebnisse des CSFV ELISA. Serum (S) und Plasma (PL) der Tiere wurden mittels IDEXX CSFV Ab ELISA getestet.....	117

Abbildung 18: Schematische Darstellung der Deletionsfragmente des CSFV Alfort/Tübingen NS3 und das BVDV CP7 NS3 mit den genutzten RE- Schnittstellen.	120
Abbildung 19: Immunfluoreszenz nach Expression der verkürzten NS3 Proteine der beiden Deletionsbibliotheken.	122
Abbildung 20: Schema der zwanzig AS-Deletionsschritte im verkürzten CP7 NS3- Fragment.....	123
Abbildung 21: Immunfluoreszenzergebnisse nach Expression der pAT19 Varianten.....	124
Abbildung 22: Detektion der exprimierten, verkürzten NS3 Proteine im Western Blot.	125
Abbildung 23: Schematische Darstellung der eingeführten 20AS Deletionen im vollständigen NS3.	126
Abbildung 24: Immunfluoreszenz nach Expression der NS3 Proteine mit 20AS Deletionen.....	127
Abbildung 25: Detektion der exprimierten NS3 Varianten mittels Code4 und WB112 im Western Blot.	128
Abbildung 26: Schematische Darstellung der eingeführten Veränderung in pAT1 für den Alaninscan.	130
Abbildung 27: Immunfluoreszenzanalyse des Alaninscans mittels Pentamersubstitutionen.....	131
Abbildung 28: Detektion der für den Alaninscan exprimierten NS3 Varianten mittels Code4 und polyklonalem Serum im Western Blot.	132
Abbildung 29: Alaninsubstitutionsbereich #9 in der Fluoreszenz.....	133
Abbildung 30: Schematische Darstellung der eingeführten Veränderungen in pAT1 für das Feinmapping.	134
Abbildung 31: Immunfluoreszenzdetektion der Alanindoppelsubstitutionsmutanten.....	135
Abbildung 32: Detektion der exprimierten Proteine mit Alanindoppel- substitution.	136
Abbildung 33: Nachweis der Generierung infektiöser Viren durch EP von RNA.	138
Abbildung 34: Wachstumskurve der Code4 negativen Virusvariante pAT92 im Vergleich zum Wildtypvirus 798 mit Standardabweichung.	139

Abbildung 35: Proteinsequenzvergleich verschiedener BVDV, CSFV, BDV sowie atypischer Pestiviren im in dieser Arbeit eingegrenzten Bereich.	140
Abbildung 36: Immunfluoreszenzanalyse der Alanindoppelsubstitutionen in NS3 Proteinen verschiedener Pestiviren.	143
Abbildung 37: Detektion der Alanindoppelsubstitutionsmutanten im NS3 verschiedener Pestiviren im Western Blot.....	144
Abbildung 38: Immunfluoreszenzanalyse des Alaninscans mittels Pentamersubstitutionen im NS3 des BVDV 296.	146
Abbildung 39: Immunfluoreszenz der Pentamersubstitutionsvarianten im NS3 des CSFV Alfort/Tübingen.....	147
Abbildung 40: Alaninpentamersubstitutionsvarianten in der Immunodetektion mittels Western Blot.....	148
Abbildung 41: Darstellung der Lokalisation der Abschnitte, welche durch Deletion von zwanzig Aminosäuren verändert wurden.	150
Abbildung 42: Lokalisation der Alaninpentamersubstitutionen in der 3D Struktur.	151
Abbildung 43: Lokalisation der Alanindoppelsubstitutionen in der 3D Struktur mit CP7 angepasster Aminosäuresequenz.	153
Abbildung 44: Schematische Zusammenfassung der Analysen der BVDV CP7 Deletionsfragmente in Bezug auf die Lokalisation der eingegrenzten Bindungsregion des mAks Code4.....	172

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virus-Medium-Suspension zur Infektion von Zellen.....	55
Tabelle 2: Reaktionsansatz für die RT-PCR.....	59
Tabelle 3: RT-PCR Programm	59
Tabelle 4: Sequenzieransatz	61
Tabelle 5: Programmablauf der Sequenzierungs-PCR.....	61
Tabelle 6: Vergabe der klinischen Punktzahlen nach Mittelholzer	63
Tabelle 7: Zusammensetzung der Primer-Sonden-Mixturen	67
Tabelle 8: Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR	68
Tabelle 9: Programmablauf der duplex real-time RT-PCR	68
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Standard PCR mit der Phusion-Polymerase.	71
Tabelle 11: Programm für die Standard PCR unter Verwendung der Phusion- Polymerase	71
Tabelle 12: Reaktionsansatz der Fusions-PCR.....	72
Tabelle 13: Fusions PCR - Schematische Übersicht über den Ablauf der PCR	72
Tabelle 14: QC-Reaktionsansatz	73
Tabelle 15: Programmablauf QC-PCR.....	73
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Ligation.....	75
Tabelle 17: Reaktionsansatz der In vitro Transkription.....	76
Tabelle 18: Pipettierschema für SDS-Gele (2 oder 4) unterschiedlicher Konzentrationen.	82
Tabelle 19: Übersicht zu Gruppen, Stallverteilung, eingesetzten Viren sowie internen Tiernummern	87
Tabelle 20: Zeitplan und Probennahme TV# 61/13	88
Tabelle 21: Rücktitrationen der zurückgestellten Virussuspensionen TV#61/13.	89
Tabelle 22: Virusnachweis mittels real-time RT-PCR.	96
Tabelle 23: Ergebnisse der Virusanzucht in SK6 Zellen aus Leukozytenpräparationen im Doppelansatz.	97
Tabelle 24: Codon 210 – Nukleotidtriplets in verschiedenen Virusreisolaten aus Leukozytenpräparationen verschiedener Blutentnahmetage.	98
Tabelle 25: Reziproke Titer der neutralisierenden Antikörper gegen CSFV TV#61/13. Mittelwerte der reziproken Titer neutralisierender	

Antikörper in Seren der Tiere getestet in Triplets in drei unabhängigen Untersuchungen gegen 100 KID ₅₀ CSFV Alfort/Tübingen.....	99
Tabelle 26: Übersicht zu Gruppen, Stallverteilung, eingesetzten Viren sowie internen Tiernummern für TV# 02/15	103
Tabelle 27: Zeitplan und Probennahme TV#02/15.....	104
Tabelle 28: Rücktitrationen der zurückgestellten Virussuspensionen TV#02/15.....	105
Tabelle 29: Virusnachweis mittels real-time RT-PCR.	112
Tabelle 30: Virusnachweis aus Leukozytenkonzentrat in Zellkultur im Doppelansatz.....	113
Tabelle 31: Sequenzen des Codons 210 in reisolierter RNA aus 1990CII infizierten Tieren nach RT-PCR und Sequenzierung mit M348+.	114
Tabelle 32: reziproke Titer der neutralisierenden Antikörper gegen CSFV TV#02/15.....	115

X. DANKSAGUNG

DANKE! DANKE! DANKE! Einfach nur DANKE an alle, die mich bei dieser Arbeit und während der Zeit unterstützt haben, ohne euch wäre das nix geworden!

Mein ganz besonderer DANK gilt Prof. Gregor Meyers, denn nur durch die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sowie durch zahlreiche wissenschaftliche Hinweise und konstruktive Diskussionen konnte diese Arbeit entstehen.

Ein herzliches DANKESCHÖN an Herrn Prof. Sutter für das Ermöglichen der Promotion an meiner Alma Mater.

Birke und Tine, DANKE für das Teilen eures molekularbiologischen, virologischen und immunologischen Wissens mit mir. Euer Input, sei es für Klonierungsstrategien aber auch beim Vorbereiten von Vorträgen war für mich eine unermessliche Hilfe.

DANKE an Gaby fürs geduldige Einlernen, deine Hilfe bei diversen Suchaktionen und deiner immerwährenden Unterstützung auch von zu Hause aus!

DANKE an alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Meyers und Luttermann, Neu wie Alt, die mich auf dem Weg begleitet haben! Jeder von euch ist irgendwie Teil dieser Arbeit. DANKE für eure Hilfe bei allen möglichen Problemen und Problemchen. Und für das außerordentlich gute Arbeitsklima! Mit euch wurde der Laboralltag nie langweilig.

DANKE an die Mitarbeiter des Friedrich-Loeffler-Instituts, die mich durch ihre Unterstützung ein Stückchen näher an mein Ziel gebracht haben.

Fine, DANKE für deine Geduld mit mir beim Korrekturlesen.

Last but not least, DANKE an meinen Mann und meine Familie! Ohne eure seelische und moralische Unterstützung und Geduld hätte ich es nicht geschafft die 2 Buchstaben vor meinen Namen zu bekommen.